

VÂNIA RIBEIRO FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO ANALÍTICO PARA EXTRAÇÃO E
FRACIONAMENTO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS E
AROMÁTICOS EM SEDIMENTOS**

Curitiba

2010

VÂNIA RIBEIRO FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO ANALÍTICO PARA EXTRAÇÃO E
FRACIONAMENTO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS E
AROMÁTICOS EM SEDIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Andreia Neves
Fernandes (UCS)

Curitiba

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

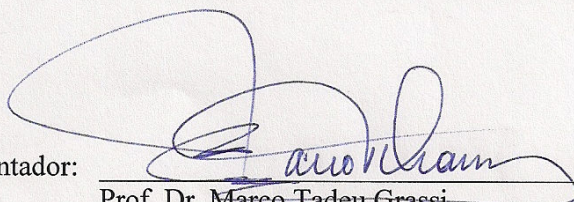
**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO ANALÍTICO PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO
DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS E AROMÁTICOS EM SEDIMENTOS**

por

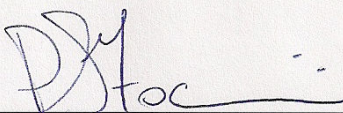
VÂNIA RIBEIRO FERREIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

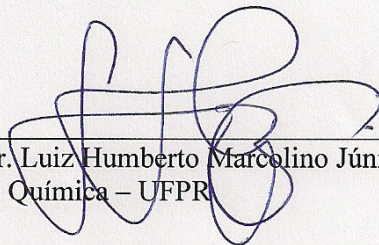
Orientador:



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini
Dep. de Química – UFSCAR



Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 01 de setembro de 2010.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela força e inspiração em todos os momentos.

A toda minha família pela torcida e incentivo.

Aos meus orientadores Marco Tadeu Grassi e Andreia Neves Fernandes pela orientação, confiança e oportunidades de aprendizado e crescimento oferecido durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos pela paciência e carinho.

Aos colegas do GQA, LabQAM e Laboratório de Análises Ambientais pela ajuda e troca de experiências.

Aos professores Gilberto Abate e Luiz Humberto Marcolino Junior pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores Luiz Humberto Marcolino Junior e Pedro Sérgio Fadini por participarem da banca de defesa e pelas contribuições oferecidas.

A Petrobras e Capes pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Papel dos Sedimentos em Ambientes Aquáticos.....	2
1.2 Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos	2
1.3 Total de Hidrocarbonetos de Petróleo (THP).....	10
1.4 Métodos de Extração de Hidrocarbonetos em Sedimentos	11
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Etapas do trabalho	16
3. Material e Métodos	16
3.1 Reagentes.....	16
3.2 Limpezas de Vidrarias	16
3.3 Preparo dos Sedimentos	17
3.4 Extração por Ultrassom	17
3.5 Extração por Soxhlet	18
3.6 Cleanup.....	18
3.7 Avaliação das Etapas de Concentração, Extração e Cleanup	19
3.8 Teste de Adição e Recuperação de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos ...	21
3.9 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos de Material de Referência ...	22
3.10 Controle e Garantia de Qualidade	22
3.11 Determinação dos Hidrocarbonetos por Cromatografia em Fase Gasosa	22
4. Resultados e Discussão.....	26
4.1 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos por Ultrassom	26

4.2 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos por Sistema Soxhlet.....	28
4.2.1 Avaliação do Tempo de Extração	28
4.3 Avaliação das Etapas de Concentração, Extração e Cleanup através de Testes de Recuperação.....	29
4.3.1 Etapa de Concentração	29
4.3.2 Etapa de Extração	35
4.3.3 Etapa de <i>Cleanup</i>	36
4.3.3.1 <i>Cleanup</i> para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (THP).....	36
4.3.3.2 Fracionamento de Hidrocarbonetos Alifáticos e HPA.....	39
4.4 Validação do método otimizado.....	43
4.4.1 Linearidade.....	43
4.4.2 Limites de Detecção e Quantificação	47
4.4.3 Exatidão e Precisão	50
4.4.3.1 Teste de Adição e Recuperação de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos.....	50
4.4.3.2 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos de Material de Referência.....	52
5. Conclusões	56
6. Referências Bibliográficas.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores orientadores de concentração de HPA em sedimentos (marinho e de água doce) e na coluna d'água (água doce e marinha) nos EUA.	6
Tabela 2: Valores orientadores de concentrações de HPA em sedimentos (marinho e de água doce), solo e na coluna d'água (água doce) no Canadá.	7
Tabela 3: Padrões de qualidade para HPA das águas do Brasil do CONAMA 357/2005.	8
Tabela 4: Valores orientadores de concentração de HPA em água subterrânea e solos da CETESB, 2005.	8
Tabela 5: Massa molar e propriedades físico-químicas dos principais HPA prioritários de acordo com a EPA.	9
Tabela 6: Valores referência de THP para solo, considerando-se um teor de argila de 25% e de matéria orgânica de 10% para água subterrânea, e considerando-se um solo com teor de argila e de matéria orgânica de 0%.	10
Tabela 7: Diferentes condições descritas na literatura para as etapas de extração, concentração e <i>cleanup</i>	15
Tabela 8: Parâmetros operacionais usados para a determinação dos alifáticos.	23
Tabela 9: Íons de quantificação dos 16 HPA, padrões interno e <i>p</i> -terfenil- <i>d</i> 14.	24
Tabela 10: Parâmetros operacionais usados para a determinação dos HPA.	25
Tabela 11: Concentrações de alifáticos obtidas nas extrações por ultrassom.	26
Tabela 12: Valores de recuperação para o padrão subrogado de <i>n</i> -alcanos.	27
Tabela 13: Valores de recuperação para os padrões subrogados de alifáticos e HPA, para os tempos de extração de 4, 6 e 8 horas.	28
Tabela 14: Condições empregadas nos testes do <i>cleanup</i>	37
Tabela 15: Faixas de recuperação obtidas para os alifáticos e HPA.	37
Tabela 16: Condições empregadas nos testes do <i>cleanup</i>	39
Tabela 17: Faixas de recuperação obtidas para os HPA e alifáticos.	39
Tabela 18: Melhores condições encontradas para as etapas de extração, concentração e <i>cleanup</i>	42
Tabela 19: Valores de R obtidos através da curva analítica dos 16 HPA e padrão subrogado <i>p</i> -terfenil- <i>d</i> 14.	43

Tabela 20: Valores de R obtidos através da curva analítica de hidrocarbonetos alifáticos e padrões subrogados (C_{20d} , C_{24d} e C_{30d}).	44
Tabela 21: Limites de detecção e quantificação obtidos para os HPA.	48
Tabela 22: Limites de detecção e quantificação obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos.....	49
Tabela 23: Percentuais de recuperação e estimativa de desvio padrão relativo ($n=6$) obtido para os padrões subrogados p -terfenil- d_{14} e Eicosano(C_{20d}).	52
Tabela 24: Recuperação média de HPA ($n=10$) no material de referência e no padrão subrogado p -terfenil- d_{14}	54
Tabela 25: Recuperação média de alifáticos ($n=10$) do material de referência e do padrão subrogado Eicosano (C_{20d}).	55

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do hidrocarboneto n-C ₁₇	3
Figura 2. Estrutura química dos isoprenóides: (a) pristano e (b) fitano.	4
Figura 3. Estrutura química dos 16 HPA considerados poluentes prioritários pela EPA.	5
Figura 4. Coluna utilizada no <i>cleanup</i> empacotada com a) Na ₂ SO ₄ , b) alumina e c) sílica.	19
Figura 5. Sistema de rotaevaporação utilizado na etapa de concentração com a) banho de gelo, b) bomba de vácuo, c) condensador e d) sistema de aquecimento.	20
Figura 6: Perfil cromatográfico de solução padrão de alifáticos (n-C ₁₀ a n-C ₄₀), e dos isoprenóides pristano e fitano.	23
Figura 7: Perfil Cromatográfico de solução padrão contendo os 16 HPA, padrão interno e seus respectivos tempos de retenção.	25
Figura 8. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração antes e após utilização do banho de gelo. (Linha pontilhada representa valor de recuperação mínimo aceitável).....	30
Figura 9. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração após utilização do banho de gelo.	31
Figura 10. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração com a secagem total do solvente e recuperação dos analitos com hexano:DCM e concentração até 1 mL no rotaevaporador.	32
Figura 11. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração com a secagem total do solvente e recuperação dos analitos com hexano:DCM e concentração até 1 mL no rotaevaporador.	32
Figura 12. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração utilizando nitrogênio com uma pressão de 2 kgf cm ⁻² sem a lavagem do balão e utilizando nitrogênio com uma pressão de 0,5 kgf cm ⁻² e 3 lavagens do balão.....	33
Figura 13. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração utilizando nitrogênio com uma pressão de 2 kgf cm ⁻² sem a lavagem do balão e utilizando nitrogênio com uma pressão de 0,5 kgf cm ⁻² e 3 lavagens do balão.....	34
Figura 14. Recuperação de HPA após extração em soxhlet utilizando banho de gelo para resfriamento do condensador.	35
Figura 15. Recuperação de alifáticos após extração em soxhlet utilizando banho de gelo para resfriamento do condensador.....	35

Figura 16. Cromatograma representativo do teste de extração dos alifáticos, ilustrando elevação da linha base.	36
Figura 17. Comparação entre o <i>cleanup</i> mais eficiente (teste E: F_1 = 25 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) e o menos eficiente (teste A: F_1 = 50 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 30 mL hexano + 20 mL DCM) para os HPA.	38
Figura 18. Comparação entre o <i>cleanup</i> mais eficiente (teste E: F_1 = 25 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) e o menos eficiente (teste A: F_1 = 50 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 30 mL hexano + 20 mL DCM) para os alifáticos.	39
Figura 19. Recuperação de HPA nas frações F_1 (50 mL de hexano) e F_2 (50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) no <i>cleanup</i> A.	40
Figura 20. Recuperações de alifáticos nas frações F_1 (50 mL de hexano) e F_2 (50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) no <i>cleanup</i> A.	40
Figura 21. Recuperações de HPA nas frações F_1 (40 mL de hexano) e F_2 (50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) no <i>cleanup</i> B.	41
Figura 22. Comparação entre os resultados de recuperação de HPA obtidos com os <i>cleanups</i> A (F_1 = 50 mL de hexano) e B (F_1 = 40 mL de hexano).	41
Figura 23. Comparação entre resultados de recuperação de alifáticos obtidos com os <i>cleanups</i> A (F_1 = 50 mL de hexano) e B (F_1 = 40 mL de hexano).	42
Figura 24. Curva analítica do naftaleno com seu valor de coeficiente de correlação (R).	45
Figura 25. Curva analítica do benzo(a)pireno com seu valor de coeficiente de correlação (R).	45
Figura 26. Curva analítica do dodecano (C_{12}) com seu valor de coeficiente de correlação (R).	46
Figura 27. Curva analítica do n-hentriacontano (C_{31}) com seu valor de coeficiente de correlação (R).	46
Figura 28. Recuperação e estimativa de desvio padrão ($n=6$) de <i>spike</i> de solução de HPA (150 ng g ⁻¹) em sulfato de sódio.	51
Figura 29. Recuperação e estimativa do desvio padrão ($n=6$) de <i>spike</i> de solução de alifáticos (10 µg g ⁻¹) em sulfato de sódio.	51
Figura 30. Concentração média ($n=10$) de HPA recuperada e concentração média ($n=13$) de sedimento de referência (LABMAM) e respectivas estimativas de desvio padrão absoluto.	53
Figura 31. Concentração média ($n=10$) de alifáticos recuperada e concentração média ($n=13$) no material de referência (LABMAM) e respectivas estimativas de desvio padrão absoluto.	53

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ace – Acenafteno
Aci – Acenaftileno
Ant – Antraceno
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE – *Accelerated Solvent Extraction*
ATSDR – Agency for Toxic Substances and Diseases Registry
BaA – Benzo(a)antraceno
BaP – Benzo(a)pireno
BbkF – Benzo (b+k)fluoranteno
Bghip – Benzo(g,h,i)perileno
CEQG – *Canadian Environmental Quality Guidelines*
CERCLA – *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG-EM – Cromatografia em Fase Gasosa / Espectrômetro de Massas
CG-DIC – Cromatografia em Fase Gasosa / Detector de Ionização em Chama
CMC – Critério de Concentração Máxima
CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cris – Criseno
C^s – Solubilidade em Água
DahA – Dibenzo(a,h)antraceno
DCM – Diclorometano
EFS – Extração por fluído supercrítico
EPA – *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana)
ERL – Faixa de Efeitos Baixos
Fen – Fenantreno
Fla – Fluoranteno
Flu – Fluoreno
FR – Fator de Resposta
HCl – Ácido Clorídrico
HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC – High-performance liquid chromatography
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IP – Indeno(1,2,3-cd)pireno
ISQG – *Interim Sediment Quality Guideline*
Kow – Coeficiente de Partição Octanol-água
LABMAN – Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
M.M. – Massa Molar
MSI – Monitoramento Seletivo de Íons
N₂ – Nitrogênio
Naf – Naftaleno
NIST – *National Institute of Standards and Technology*
NOOA – *National Oceanic and Atmospheric Administration*
P- Pressão de Vapor
P.E – Ponto de Ebulição
P.F – Ponto de Fusão
PEL – *Probable Effect Level*
Pir – Pireno
PUC – Pontifícia Universidade Católica
R – Coeficiente de Correlação
S – Coeficiente Angular da Reta
s – Estimativa do Desvio Padrão da Equação da Reta
S/R – Razão sinal ruído
SFE – *Supercritical Fluid Extraction*
TEL – *Theshold Effect Level*
THP – Total de Hidrocarbonetos de Petróleo
UCM – *Unresolved Complex Mixture*
UET – Limite Superior de Efeito
 σ – Desvio Padrão Absoluto

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo aperfeiçoar as etapas de extração, concentração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (HPA), buscando com isso a melhoria de um método analítico já validado, empregado na determinação de hidrocarbonetos de petróleo. Cada uma das etapas foi avaliada separadamente, por meio de testes de recuperação, com concentrações conhecidas dos analitos e de padrões subrogados. Na etapa de extração foi avaliada a influência da temperatura no sistema de resfriamento do extrator soxhlet, além de serem estudados diferentes tempos de extração (4, 6 e 8 horas). Na etapa de concentração avaliou-se a temperatura do sistema de resfriamento do rotaevaporador, além da influência da utilização de nitrogênio para concentração dos analitos. Na etapa de *cleanup* foram estudados diferentes solventes de eluição para os hidrocarbonetos alifáticos e diferentes polaridades de misturas de solventes para eluição dos HPA. Os resultados obtidos em todas as etapas ficaram dentro da faixa de 70 a 120%, valores considerados aceitáveis. Após a otimização, o método foi validado por meio da avaliação de parâmetros de mérito, tais como linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão. A linearidade, LD e LQ, foram estudados através das curvas analíticas construídas para as duas classes de compostos, com valores de coeficiente de correlação (R) maiores que os recomendados pelo INMETRO (0,90). Além disso, os valores de LD e LQ demonstraram a grande sensibilidade do método. Os parâmetros de precisão e exatidão foram estudados por meio de ensaios de adição e recuperação dos analitos e utilização de um material de referência previamente utilizado em um estudo de intercalibração envolvendo diversos laboratórios. Através dos ensaios de adição e recuperação foram obtidos valores de estimativa de desvio padrão dentro do limite aceito pela literatura (20%) para trabalhos envolvendo concentrações traço. Além disso, a recuperação dos analitos adicionados para HPA e alifáticos variou de 59-105% e de 55-113%, respectivamente, sendo estes valores considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos. Os resultados obtidos para o material de referência apresentaram valores de estimativa de desvio padrão menores que o descrito para o material utilizado, para ambas as classes de compostos, além de terem sido obtidos valores de recuperação considerados igualmente satisfatórios. Diante destes resultados foi possível concluir que a avaliação das diversas etapas do processo proporcionou a melhoria de um método já consolidado, sendo possível obter resultados com níveis elevados de confiabilidade analítica.

Abstract

The main goals of this work were to refine the steps of extraction, concentration and fractionation of aliphatic and aromatic hydrocarbons, seeking to improve a method already validated. Each step was evaluated separately by recovery tests, with known concentrations of analytes and surrogates. In the extraction step it was evaluated the influence of temperature on the cooling system of the soxhlet extractor, besides being studied different extraction times (4, 6 and 8 hours). In the concentration step we have estimated the temperature of the cooling system of the rotatory evaporator, and the influence of nitrogen use. In the cleanup step different elution solvents were studied for aliphatic and different polarities of solvent mixtures for elution of aromatic hydrocarbons. The results in all stages were in the range of 70% to 120%, and these values were considered acceptable. After optimization, the method was validated by evaluating parameters of merit such as linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy. The linearity, LOD and LOQ were studied by means of calibration curves for the two classes of compounds, with values of correlation coefficient (R) higher than those recommended by INMETRO (0.90). Moreover, the values of LOD and LOQ demonstrated the high sensitivity of the method. Precision and accuracy were studied by recovery tests with the analytes and use of a reference material that had been previously used in an intercalibration study involving several laboratories. Standard deviation presented values within the limits accepted by the literature (20%) for studies involving trace concentrations. In addition, the recovery of the analytes added to the aliphatic and PAH ranged from 59% to 105% and 55-113%. These values can be considered suitable for the vast majority of compounds. For the reference material showed the results of standard deviation were lower than those reported for the material used for both classes of compounds. Moreover, adequate recovery values were obtained. Taking these results into account it is possible to conclude that the evaluation of various stages of the analytical process provided a way of improving an already established method. Therefore, it was possible to obtain results with high levels of analytical reliability.

1. Introdução

O acelerado desenvolvimento tecnológico e industrial propiciou avanços à civilização moderna trazendo muitas facilidades ao homem. Entretanto, estas mudanças têm contribuído com a degradação ambiental levando a um comprometimento dos recursos naturais, em função da emissão de poluentes atmosféricos, contaminação do solo e da água ou ainda, por acidentes ambientais (Silva, 2007). Além disso, o crescente aumento populacional requer uma demanda maior de matéria prima e energia que, somada a poluição resultante de processos industriais, ocasiona uma série de desequilíbrios ambientais, que acabam se tornando prejudiciais à vida do homem e à saúde de inúmeros ecossistemas (UNEP, 2002; Fronza, 2006). Os ambientes aquáticos têm funcionado como áreas receptoras dos mais variados tipos de efluentes, despejos e derrames. Por isso, diversos contaminantes continuamente alcançam os ecossistemas por meio das atividades antrópicas, e essas substâncias em sua maioria acabam permanecendo acumuladas nos sedimentos (Ockender *et al.*, 2003).

Entre as diversas substâncias contaminantes existentes destacam-se os poluentes orgânicos, que compreendem uma classe de substâncias cuja origem se dá a partir de fontes difusas e pontuais, aportando no meio ambiente pelas contribuições de processos tais como a drenagem urbana provocada pelas águas da chuva, atividades agrícolas e por meio de lançamentos de efluentes domésticos e industriais (Baird, 2002).

A determinação desses compostos em amostras ambientais, tais como sedimentos, tem sido amplamente divulgada na literatura, utilizando diferentes métodos de extração. Entretanto, uma vez que a necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas através de comparabilidade e confiabilidade tem sido cada vez mais reconhecida e exigida (Ribani e Colaboradores, 2004), torna-se cada vez mais importante a utilização de métodos validados. Em função disso, vários trabalhos têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos (Thompson *et al.*, 2002; Ribani e Colaboradores 2004, Zanella *et al.*, 2007), os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação, sendo este um tema de grande relevância.

1.1 Papel dos Sedimentos em Ambientes Aquáticos

No contexto ambiental, particularmente de corpos aquáticos, os sedimentos tornam-se importantes por conta da sua capacidade de incorporar, acumular e liberar contaminantes orgânicos e metálicos nos diferentes compartimentos ambientais, desempenhando assim um papel fundamental no comportamento e disponibilidade biológica destas substâncias (Qualised, 2003).

O aporte de contaminantes nos sistemas aquáticos pode ocorrer através de processos naturais de transporte de espécies químicas como a precipitação atmosférica seca ou úmida, lixiviação e drenagem promovida pelas águas pluviais, ou por influência antrópica advinda dos lançamentos de efluentes e águas residuais. A partir do momento que estes poluentes alcançam os corpos aquáticos, as espécies químicas podem ser adsorvidas ao material particulado em suspensão, e finalmente se acumulam no compartimento sedimentar (Baird, 2002; Viganò *et al.*, 2003; Wolska *et al.*, 2003; Leite, 2008).

Quando incorporados aos sedimentos, os contaminantes podem sofrer modificações químicas e biológicas que os disponibilizam à biota, aumentando seus efeitos nocivos. A liberação dos poluentes fica sujeita as eventuais perturbações naturais (difusão ou ressuspensão de sedimentos pelo vento ou tormentas) e antrópicas (atividades de dragagem). Além disso, pequenas alterações no sistema, como variações de pH e concentração de agentes orgânicos quelantes, podem provocar a liberação dos contaminantes para a coluna d'água (Fronza, 2006).

1.2 Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos

Dentre os poluentes orgânicos encontram-se os hidrocarbonetos, que são compostos químicos presentes na constituição da matéria orgânica de origem vegetal e animal e na composição do petróleo. Estes compostos podem ser produzidos tanto por processos naturais quanto antropogênicos. Aos processos naturais estão associadas fontes biogênicas (síntese por organismos vegetais e animais) e pirogênicas (queima de biomassa) (Commendatore e Esteves, 2004; Gao e Chen, 2008). Os processos antropogênicos dividem-se em fontes petrogênica e pirogênica (combustão incompleta de combustível fóssil) (Pietzsch *et al.*, 2010).

Os hidrocarbonetos são substâncias de caráter lipofílico e de baixa reatividade no ambiente. Essas características contribuem para seu acúmulo nos ambientes naturais, especialmente nos sedimentos, onde podem se bioconcentrar e bioacumular

(Schwazenbach *et al.*, 1995; Tolosa *et al.*, 2004). A relevância dos sedimentos como “depósitos” de hidrocarbonetos tem sido amplamente documentada na literatura (Budzinski *et al.*, 1999; Yunker *et al.*, 2000; Leite, 2008), sendo este compartimento considerado como o mais adequado para o estudo de avaliação da presença de hidrocarbonetos (Meniconi, 2007). Hidrocarbonetos como os *n*-alcanos, alcanos isoprenóides e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm sido amplamente utilizados em diferentes estudos (Volkman *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2001, Leite 2008).

Dentre os componentes do petróleo, os hidrocarbonetos alifáticos são o maior grupo de substâncias e estão classificados em *n*-alcanos (*n*-parafinas), isoalcanos (isoparafinas) e cicloalcanos (naftênicos), tendo como característica principal a baixa polaridade (Yamada, 2006). Os *n*-alcanos (Figura 1) são importantes constituintes dos hidrocarbonetos alifáticos, possuem cadeia normal e saturada, sendo produzidos tanto por organismos terrestres quanto por organismos marinhos. Podem também ser produzidos através das erupções vulcânicas e incêndios naturais (fontes pirogênicas), ou serem provenientes do petróleo e combustíveis fósseis (fontes petrogênicas) (Pietzsch *et al.*, 2010).

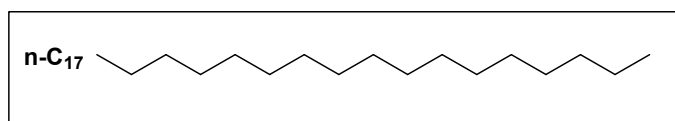


Figura 1. Estrutura química do hidrocarboneto n-C17.

Os compostos derivados do petróleo podem ser empregados para fornecer informações a respeito da origem de fontes de poluição por hidrocarbonetos, sendo possível avaliar o nível de degradação desses compostos no ambiente (Bícego *et al.*, 2006). Os isoprenóides pristano e fitano (Figura 2) podem ser usados como indicadores de contaminação por petróleo e seus derivados. Para se avaliar se um sedimento sofreu contaminação por esses compostos, pode-se utilizar como regra a razão pristano/fitano. Segundo Volkman e colaboradores (1992) a concentração de fitano em sedimentos não contaminados é praticamente nula e uma razão pristano/fitano semelhante a 1 pode indicar a presença de petróleo e seus derivados. Por outro lado, um valor dessa razão maior que 1, ou seja, que indique a predominância de pristano, está diretamente relacionado à presença de alcanos de origem biogênica (Steinhauer e Boehm, 1992; Del Rosso, 2005).

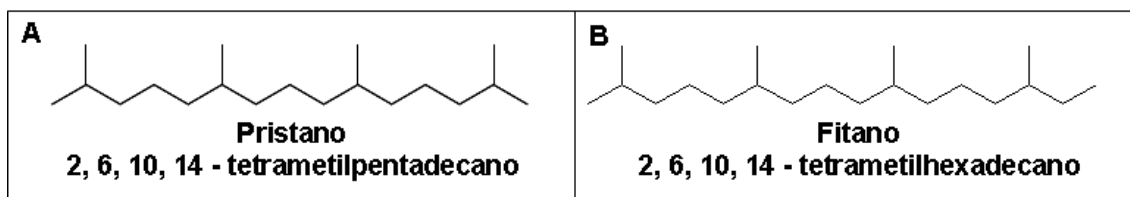


Figura 2. Estrutura química dos isoprenóides: (a) pristano e (b) fitano.

A presença de uma mistura complexa não resolvida (UCM – *Unresolved Complex Mixture*) também é um indicativo da presença de n-alcanos de origem petrogênica (Yamada, 2006). De acordo com Wu e colaboradores (2001) a mistura é constituída por uma série de isômeros estruturais de estruturas complexas não sendo possível quantificar nem identificar os compostos presentes. Pode ser produzida também pela degradação da matéria orgânica ou de resíduos de algas, porém, nesse caso, em concentrações mais baixas (Venkatesan e Kaplan, 1982). Os componentes presentes na UCM são mais resistentes a biodegradação, apresentando uma maior tendência a se acumular no sedimento e consequentemente provocando uma maior contaminação do mesmo (Aboul-Kassim e Simoneit, 1995; Coimbra, 2006).

Os HPA estão presentes em todos os compartimentos ambientais, terrestres e marinhos, constituindo uma importante classe de compostos orgânicos extensamente investigados. São compostos constituídos por pelo menos dois anéis aromáticos, apresentando como características químicas elevada hidrofobicidade, polaridade e baixa solubilidade em água. Essas características favorecem as associações destes compostos com o material particulado que se encontra em suspensão nos ambientes aquáticos (Schwazenbach *et al.*, 1995; Chu e Chan 2000).

Em 1997, a ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Diseases Registry*) juntamente com a Agência de Proteção Ambiental Norte-americana (U.S. EPA) elaborou uma lista, conhecida como *Priorit List*, de substâncias potencialmente tóxicas para os seres humanos. Essa lista é atualizada a cada dois anos, quando há uma revisão das pontuações e inclusão de novas substâncias. A partir dessa lista de 1997 a EPA passou a priorizar 16 HPA (Figura 3) em seus estudos, devido à abundância, toxicidade e potencial de exposição humana destes compostos, que têm sido então recomendados para investigação em testes de qualidade em sedimentos (U.S. EPA, 1998).

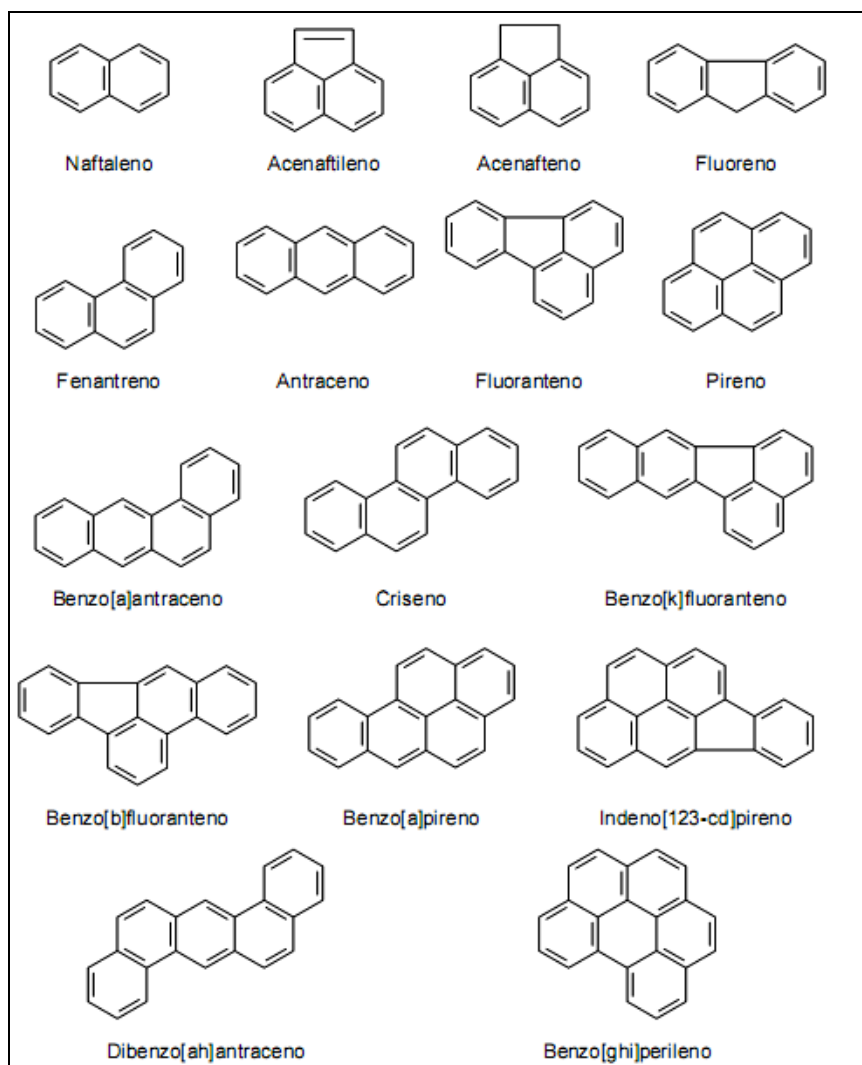


Figura 3. Estrutura química dos 16 HPA considerados poluentes prioritários pela EPA.

Em função de seu potencial carcinogênico e mutagênico, instituições governamentais em diversos países estabeleceram valores orientadores e de referência para HPA nos diversos compartimentos ambientais (solo, sedimento, água e atmosfera). Nas Tabelas 1 e 2 constam as concentrações limites dos HPA em corpos aquáticos e sedimentos nos Estados Unidos (EUA) e Canadá (NOAA, 2006; CEQG, 2006; Meniconi, 2007), respectivamente. Os valores de concentração estabelecido nos EUA são baseados nos seguintes parâmetros:

- TEL (nível limite de efeito): representa a concentração abaixo do qual raramente esperam-se efeitos adversos;
- PEL (nível de efeito provável): representa o nível acima do qual se espera que efeitos adversos ocorram frequentemente;

- UET (limite superior de efeitos): representa a concentração acima da qual se espera que sempre ocorra impacto biológico adverso no ambiente de água doce;
- ERL (faixa de efeitos baixos): representa a concentração na qual a toxicidade pode começar a ser observada em espécies sensíveis;
- AET (limite aparente de efeitos): representa a concentração acima da qual se espera que sempre ocorra impacto biológico adverso no ambiente marinho;
- CCM (critério de concentração máxima): é o maior nível para uma exposição média de 1 hora e não deve exceder mais do que uma vez a cada três anos, e é um sinônimo para agudo.

Já os valores de concentração estabelecidos pelo Canadá, além de serem baseados nos valores de PEL, se baseiam ainda no seguinte parâmetro:

- ISQG: (*interim sediment quality guideline*) valor usado quando dados são limitados e visando proteger todas as formas de vida marinha. Em todos os aspectos de seus ciclos de vida e por um tempo de exposição às substâncias químicas indefinido.

Tabela 1: Valores orientadores de concentração de HPA em sedimentos (marinho e de água doce) e na coluna d'água (água doce e marinha) nos EUA.

Composto	Sedimento de água doce (ng g ⁻¹)			Sedimento de água marinha (ng g ⁻¹)				Água Marinha (µg L ⁻¹)
	TEL	PEL	UET	TEL	ERL	AET	PEL	CMC
Naftaleno	14,6	-	600	34,5	160	230	390,6	2350
Acenaftileno	-	-	160	5,8	44	71	127,8	300
Acenafteno	-	-	290	6,7	16	130	88,9	970
Fluoreno	10	-	300	21,1	19	120	144,3	300
Fenantreno	18,7	515	800	86,6	240	660	543,5	7,7
Antraceno	10	-	260	46,8	85,3	280	245	300
Fluoranteno	31,4	2355	1500	112,8	600	1300	1493,5	40
Pireno	44,2	875	1000	152,6	665	2400	1397,6	300
Benzo(a)antraceno	15,7	385	500	74,8	261	960	692,5	300
Criseno	26,8	862	800	108	384	950	845,9	300
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-	1800	-	300
Benzo(k)fluoranteno	27,2	-	13400	-	-	-	-	300
Benzo(a)pireno	32,4	782	700	88,8	430	1100	763,2	300
Indeno(1,2,3-cd)pireno	17,3	-	330	-	-	600	-	300
Dibenzo(ah)antraceno	10	-	100	6,2	63,4	230	134,6	300
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	300	-	-	670	-	300
HPA Total	264	-	12000	1684,0	4022	-	1670,4	300

Tabela 2: Valores orientadores de concentrações de HPA em sedimentos (marinho e de água doce), solo e na coluna d'água (água doce) no Canadá.

Composto	Sedimento de água doce (ng g ⁻¹)		Sedimento de água marinha (ng g ⁻¹)		Solo (mg kg ⁻¹)	Água Doce (µg L ⁻¹)
	ISQG	PEL	ISQG	PEL	Agricultura	Vida Aquática
Naftaleno	34,6	391	34,6	391	0,1	1,1
Acenaftileno	5,87	128	5,87	128	-	-
Acenafteno	6,71	88,9	6,71	88,9	-	5,8
Fluoreno	21,2	144	21,2	144	-	3,0
Fenantreno	41,9	515	86,7	544	0,1	0,4
Antraceno	16,9	245	46,9	245	-	0,012
Fluoranteno	111	2355	113	1494	-	0,04
Pireno	53,0	875	153	1398	0,1	0,025
Benzo(a)antraceno	31,7	385	74,8	693	0,1	0,018
Criseno	57,1	862	108	846	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	0,1	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	0,1	-
Benzo(a)pireno	31,9	782	88,8	763	0,1	0,015
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	0,1	-
Dibenzo(ah)antraceno	6,22	135	6,22	135	0,1	-

No Brasil, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) através da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005), define as concentrações de alguns HPA em águas doces, salinas e salobras de acordo com sua classificação de padrões de qualidade da água, que varia conforme a finalidade de seu uso. Esses tipos de água são classificados pelo CONAMA como classe 1, que são destinadas: a) ao abastecimento público através após tratamento simplificado; b) a proteção das comunidades aquáticas; c) recreação; e d) irrigação de hortaliças. Já a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo) estabelece valores orientadores de diversos HPA para solos e águas subterrâneas como referência para intervenção (CETESB, 2005). Os valores estabelecidos pelo CONAMA e CETESB encontram-se nas Tabelas 3 e 4, abaixo.

Tabela 3: Padrões de qualidade para HPA das águas do Brasil do CONAMA 357/2005.

Composto	Água Doce ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Água Salina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Água Salobra ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Classe1 Tabela I	Classe 1 Tabela II ^a	Classe 1 Tabela III ^b	Classe 1 Tabela V ^a	Classe 1 Tabela VIII ^a
Benzo(a)antraceno	0,05	0,018		0,018	0,018
Benzo(b)fluoranteno	0,05	0,018	0,7	0,018	0,018
Benzo(k)fluoranteno	0,05	0,018		0,018	0,018
Benzo(a)pireno	0,05	0,018		0,018	0,018
Criseno	0,05	0,018		0,018	0,018
Dibenzo(ah)antraceno	0,05	0,018		0,018	0,018
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,05	0,018		0,018	0,018

^a Padrões para corpos de água doce onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo intenso; ^b padrão para potabilidade.

Tabela 4: Valores orientadores de concentração de HPA em água subterrânea e solos da CETESB (2005).

Composto	Valor Orientador de Intervenção	
	Águas Subterrâneas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Solo (mg kg^{-1})
Naftaleno	140	30
Fenantreno	140	15
Benzo(a)antraceno	1,75	9
Benzo(a)pireno	0,7	0,4
Dibenzo(ah)antraceno	0,18	0,15
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,17	2

Os HPA são contaminantes ambientais comumente encontrados em sedimentos nos ambientes aquáticos (Gu *et al.*, 2003), porém alguns HPA de baixa massa molar são solúveis em água, o que aumenta os riscos de contaminação por esses compostos. As propriedades físico-químicas dos 16 HPA (Tabela 5), considerados prioritários pela EPA, são consideravelmente diferentes, pois como podemos observar ocorre um decréscimo significativo na pressão de vapor, constante de Henry e solubilidade em água dos compostos de menores massas (2 a 4 anéis aromáticos) em relação aos de maiores massas molar (5 a 6 anéis aromáticos) (Cavalcante *et al.*, 2008). Compostos de baixa massa molar são mais voláteis, menos lipofílicos e, portanto, mais solúveis em água do que aqueles de maior massa molar.

Os HPA de maior massa molar resistem mais às reações de óxido-redução do que os de menor massa molar. Além disso, HPA lineares tendem a ser menos solúveis do que seus isômeros condensados. Um exemplo é o antraceno (M.M. = 178), que é 20 vezes menos solúvel do que o fenantreno, apesar das massas moleculares e números de anéis semelhantes. Em função dessas diferenças, o comportamento,

distribuição no ambiente e efeitos nos sistemas biológicos desses compostos variam significativamente (Locatelli, 2006).

Tabela 5: Massa molar e propriedades físico-químicas dos HPA prioritários de acordo com a EPA.

HPA	nº de anéis	M.M	P.F (°C)	P.E (°C)	C ^s (mg L ⁻¹)	Log K _{ow}	P (Torr a 20°C)
Naftaleno	2	128	80	218	30	3,37	$4,9 \times 10^{-2}$
Acenaftileno	3	152	92	265	3,93	4,07	$2,1 \times 10^{-2}$
Acenafteno	3	154	96	279	3,47	4,33	$2,0 \times 10^{-2}$
Fluoreno	3	166	116	293	1,98	4,18	$1,3 \times 10^{-2}$
Fenantreno	3	178	101	340	1,29	4,46	$6,8 \times 10^{-4}$
Antraceno	3	178	216	340	$7,0 \times 10^{-2}$	4,45	$1,9 \times 10^{-4}$
Fluoranteno	4	202	111	-	$2,6 \times 10^{-1}$	5,33	$6,0 \times 10^{-6}$
Pireno	4	202	149	360	$1,4 \times 10^{-1}$	5,32	$6,8 \times 10^{-7}$
Benzo(a)antraceno	4	228	158	400	$1,4 \times 10^{-2}$	5,61	$5,0 \times 10^{-9}$
Criseno	4	228	255	-	$2,0 \times 10^{-3}$	5,61	$6,3 \times 10^{-7}$
Benzo(b)fluoranteno	5	252	167	-	$1,2 \times 10^{-3}$	6,57	$5,0 \times 10^{-7}$
Benzo(k)fluoranteno	5	252	217	480	$5,5 \times 10^{-4}$	6,84	$5,0 \times 10^{-7}$
Benzo(a)pireno	5	252	179	496	$3,8 \times 10^{-3}$	6,04	$5,0 \times 10^{-7}$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	6	276	163	-	$6,2 \times 10^{-2}$	7,66	$1,0 \times 10^{-10}$
Dibenzo(ah)antraceno	5	278	262	-	$5,0 \times 10^{-3}$	5,97	$1,0 \times 10^{-10}$
Benzo(g,h,i)perileno	6	276	222	-	$2,6 \times 10^{-4}$	7,23	$1,0 \times 10^{-10}$

M.M. = massa molar; P.F. = Ponto de Fusão; P.E. = Ponto de Ebulição; C^s = Solubilidade em água; K_{ow} = Coeficiente de partição octanol-água; P = Pressão de Vapor.

O estudo da presença de HPA em matrizes ambientais possibilita a identificação das fontes de contaminação desses compostos, e, adicionalmente, viabiliza o acompanhamento da degradação e destino desses poluentes em ambientes naturais (Yunker *et al.*, 2002; Garcia, 2005). Os HPA de baixa massa molar, por exemplo, estão associados à contaminação recente, ao contrário dos de alta massa molar, que indicam uma contaminação mais antiga (Mouhri *et al.*, 2008; Pietzsch *et al.*, 2010). Além disso, através da razão de alguns isômeros de HPA é possível diferenciar fontes de contaminação em petrogênicas e/ou pirogênicas (Leite *et al.*, 2008).

1.3 Total de Hidrocarbonetos de Petróleo (THP)

A determinação do total de hidrocarbonetos de petróleo (THP) em amostras ambientais também é bastante utilizada na avaliação de impactos causados por derramamentos de petróleo. O termo THP é usado para descrever a concentração total de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos resolvidos extraídos de amostras ambientais. As concentrações de THP são usualmente determinadas por meio de extração com solvente apropriado e posterior análise por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama ou algumas vezes por espectrometria de massas. Em geral a quantificação é feita com base na área total dos picos obtidos através do cromatograma (Barry *et al.*, 2009). Utiliza-se muito a cromatografia em fase gasosa para a determinação de THP, porque além do alto grau de sensibilidade e seletividade, ela pode ser usada para a identificação individual dos hidrocarbonetos (Criteria Working Group, 1998).

A legislação brasileira não estabelece valores orientadores de concentração de THP nos diversos compartimentos ambientais. Entretanto, em trabalhos envolvendo a determinação de THP, pode-se utilizar como referência a Lista Holandesa de valores de qualidade do solo e de água subterrânea. A característica principal dessa proposta é a criação de três valores distintos (STI) de qualidade:

- Valor de referência (S): indica um nível de qualidade do solo e da água subterrânea que permite considerá-los limpos, com sua utilização para qualquer finalidade;
- Valor de intervenção (I): indica um nível de qualidade do solo acima do qual existem riscos para a saúde humana e para o ambiente;
- Valor de alerta (T): é o valor médio entre os dois primeiros S e I. Indica que já ocorreu certa alteração que diminui, ainda que pouco, as propriedades funcionais do solo. Segue abaixo os valores concentração de THP estabelecidos por esta lista para amostras de solo e água (Tabela 6).

Tabela 6: Valores referência de THP para solo, considerando-se um teor de argila de 25% e de matéria orgânica de 10% para água subterrânea, e considerando-se um solo com teor de argila e de matéria orgânica de 0%.

Solo			Água Subterrânea		
Concentração de THP em peso seco (mg kg ⁻¹)			Concentração de THP (µg L ⁻¹)		
S	T	I	S	T	I
50	2525	5000	50	325	600

1.4 Métodos de Extração de Hidrocarbonetos em Sedimentos

Os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos desempenham um papel importante em estudos ambientais, principalmente àqueles relacionados à investigação da contaminação de sedimentos por petróleo e seus derivados. Devido a sua alta hidrofobicidade esses compostos encontram-se principalmente depositados no interior dos sedimentos, e para serem determinados é necessário aplicar técnicas de extração para removê-los da matriz em estudo.

De maneira geral, o estudo da presença de hidrocarbonetos em sedimentos pode ser dividido em duas etapas: a primeira está relacionada ao preparo da amostra para obtenção de um extrato contendo os analitos de interesse e a segunda envolve a determinação dos compostos por cromatografia. A etapa de preparo de amostra envolve: a) coleta, armazenamento e preparo do sedimento; b) extração com solvente; c) eliminação de compostos interferentes e fracionamento dos compostos extraídos (*cleanup*); e d) concentração dos analitos. Na segunda etapa é realizada a determinação qualitativa e quantitativa por cromatografia, que pode ser cromatografia em fase líquida ou fase gasosa. Em cada uma das etapas envolvidas no preparo de amostra, devem ser tomados diversos cuidados de forma a não comprometer os resultados esperados.

Para que um composto seja extraído é necessário que ele interaja com o solvente selecionado, sendo essa interação dependente de três principais fatores: tempo de contato (interação), solubilidade no solvente e acessibilidade efetiva do solvente ao composto presente no sedimento, ou seja, a extração também depende das características de cada sedimento. Por exemplo, para extrair um composto mais apolar não basta usar um solvente de polaridade baixa, pois os grupamentos polares presentes nos sedimentos como aminas, fenóis e ácidos carboxílicos vão impedir que esse solvente interaja com os compostos mais internos. Para que a interação com os compostos seja efetiva é necessário escolher um solvente de polaridade média ou então uma mistura de solventes (Smeds e Boer, 1997; Del Rosso, 2005). Além disso, a distribuição granulométrica do sedimento é uma característica importante, sedimentos mais finos, com uma superfície de adsorção mais elevada, tendem a apresentar maior afinidade com os hidrocarbonetos que os sedimentos com maior granulometria (Meniconi, 2007).

Na literatura encontram-se descritos diversos métodos de extração de hidrocarbonetos em sedimentos, os mais utilizados são sistema soxhlet (Martins *et al.*, 2004; Tolosa *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2008; Orecchio, 2010), extração por ultrassom (Bossio *et al.*, 2008; Pietzsch *et al.*, 2010) e extração por agitação (Berset et

al., 1999, Brum *et al.*, 2009). Outras técnicas também vêm sendo aplicadas, tais como extração acelerada por solvente (ASE – *Accelerated Solvent Extraction*) (Heemken *et al.*, 1997, Mostafa *et al.*, 2009), extração em fluido supercrítico (SFE – *Supercritical Fluid Extraction*) (Librando, 2004; Gan *et al.*, 2009) e extração assistida por micro-ondas (Budzinski *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2003; Serrano e Galego, 2006).

Na extração por soxhlet (método 3540 – U.S. EPA, 1996) o solvente é aquecido, passando pela amostra de solo ou sedimento continuamente por 16-24 horas. Como o volume gerado ao final da extração é relativamente grande, em torno de 200 mL, esse necessita ser concentrado. Por isso, é mais apropriado para extração de compostos semivoláteis do que de voláteis, sendo considerado um método clássico para esse tipo de análise. Outra técnica que vem sendo bastante utilizada é a extração por ultrassom (método 3550 – U.S. EPA, 2007), que envolve o uso de ondas sonoras para agitar a amostra imersa em solvente orgânico e assim ajudar a transferir o analito da amostra para o solvente. O ultrassom é uma técnica mais rápida do que a extração por soxhlet, e também pode requerer menos solvente. Na extração por solvente acelerada (método 3545 – U.S. EPA, 1996), o solvente é aquecido, pressurizado e passado através da amostra. Esse método apresenta eficiência de extração comparável às extrações por soxhlet, porém juntamente com as extrações por fluido supercrítico e por micro-ondas requer investimento em equipamento de custo elevado. Na extração por fluido supercrítico (método 3545 – U.S. EPA, 1996), o líquido supercrítico é passado através da amostra e os analitos são concentrados em um recipiente sendo em seguida eluídos com um solvente. Essa técnica tem a vantagem de requerer volumes de solventes menores do que técnicas tradicionais de extração por solvente. A extração assistida por micro-ondas (método 3535 – U.S. EPA, 2000) envolve o uso da energia produzida pelas micro-ondas para produzir condições de elevada temperatura e pressão em um recipiente fechado contendo a amostra e o solvente orgânico.

Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens e a escolha de cada uma delas depende de diversos fatores, como por exemplo, custo capital e operacional, facilidade de uso, além da disponibilidade de materiais e equipamentos no laboratório que tornem o experimento viável. Algumas vezes, outro fator a ser levado em consideração é a necessidade de se utilizar um método validado e consolidado, uma vez que os resultados analíticos gerados são geralmente utilizados em tomadas de decisão, o que quase sempre se traduz em recursos financeiros, alocação de recursos humanos e ações legais, em especial nas questões ambientais (Jardim e Sodré, 2009). Entretanto, esses métodos, em alguns casos, apresentam deficiências

precisando ser melhorados. Dentro desse contexto, se encontra o emprego de sistema soxhlet para extração de hidrocarbonetos alifáticos e HPA presentes em sedimentos.

Diversos trabalhos têm sido descritos na literatura utilizando a extração por soxhlet com bons resultados. Tolosa e co-autores (2004) descrevem o trabalho onde foi utilizada a extração por soxhlet para determinação das fontes de hidrocarbonetos presentes em sedimentos coletados no Mar Cáspio. De forma semelhante, Martins e colaboradores (2004) utilizaram essa extração em estudos envolvendo a presença de alcanos em sedimentos coletados próximo da estação brasileira na Antártica. Del Rosso (2005) também trabalhou com o sistema soxhlet para extração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos com o objetivo de determinar as fontes de aporte desses compostos para a Lagoa dos Patos (RS). Luz e colaboradores (2010) também utilizaram essa técnica de extração para a determinação de fontes de contaminação de HPA na região da Colônia Z3, uma comunidade pesqueira na cidade de Pelotas (RS) e obteve resultados de recuperação na extração entre 70 e 86%.

Também são relatados trabalhos comparando outras técnicas de extração com o sistema soxhlet. Em um estudo comparativo entre soxhlet e extração por fluido supercrítico (EFS) Crespo e Yuist (2006) constataram que apesar da EFS apresentar menores tempos de extração, foi menos eficiente na extração de n-alcanos, principalmente para os de cadeia menor, com recuperações abaixo de 70% para o pristano, C₁₈ e C₁₉. Sun e colaboradores (2005) compararam as técnicas de extração por ultrassom e soxhlet e concluíram que o sistema soxhlet foi o método mais eficiente (Furlan, 2006). Richter e colaboradores (2006) também constataram em seu trabalho que os resultados de extração foram melhores utilizando a extração por soxhlet do que para o ultrassom.

Apesar da extração por sistema soxhlet apresentar bons resultados, ser um método validado e consolidado, sendo recomendado pela EPA (método 3540C – U.S. EPA, 1996), esse ainda apresenta uma série de desvantagens, pois exige um elevado consumo de solvente (60 a 200 mL) e necessita de longos tempos de extração (6 – 48 h) para que o processo seja eficiente. Entretanto, apesar de todas as desvantagens descritas anteriormente e da extração por soxhlet ser dentre as técnicas de extração, a mais trabalhosa e demorada, ela ainda é o método padrão exigido quando os resultados analíticos de hidrocarbonetos obtidos são, por exemplo, utilizados em questões judiciais envolvendo, entre outros, casos de acidentes ambientais com petróleo e seus derivados.

Independentemente da técnica empregada, quando se faz a extração dos analitos de interesse, também podem ser extraídos interferentes. Compostos polares tais como gorduras, proteínas e pequenas moléculas biológicas podem ser

identificadas erroneamente como constituintes de petróleo. Dessa forma, realiza-se também o *cleanup* após a extração dos compostos. O *cleanup* é a etapa de limpeza, onde são retiradas as impurezas que podem interferir na determinação cromatográfica, além de serem separadas as frações dos compostos de interesse. Em uma situação ideal, somente os compostos interferentes são removidos, mas na realidade, alguns constituintes polares do petróleo também podem ser removidos. Duas técnicas são usadas para o *cleanup* de extratos de petróleo. Em uma delas, os compostos interferentes são removidos pela passagem do extrato através de uma coluna de vidro recheada com um adsorvente. Uma segunda é a agitação do extrato com o adsorvente, removendo então este último por filtração. As técnicas de *cleanup* preconizadas pela EPA envolvem remoção dos compostos interferentes por meio de uma coluna recheada com adsorvente. O método 3611 da EPA (1996) usa alumina como adsorvente para remover os compostos interferentes e o método 3630 (1996) emprega sílica gel como adsorvente. Além dos adsorventes, devem também ser utilizados solventes para eluição e dependendo do procedimento adotado, pode ocorrer um consumo elevado desses produtos e conseqüentemente um maior tempo é gasto para realização dessa etapa (Helaleh *et al.*, 2005; Cavalcanti, 2007).

Além de todos esses aspectos, no *cleanup* podem ocorrer perdas de compostos por volatilização, ou os compostos podem ficar retidos na coluna caso não seja escolhido um solvente de eluição com polaridade adequada às características dos compostos de interesse, o que irá interferir nos resultados finais. Por isso, escolher um bom procedimento de *cleanup* é tão importante quanto a escolha de uma boa técnica de extração, pois seus efeitos vão se somar aos da etapa de extração, para a obtenção de melhores resultados na determinação de hidrocarbonetos em sedimentos. Outra etapa que merece bastante atenção no processo é a pré-concentração dos analitos, pois existe a possibilidade de perdas dos compostos por volatilização. Em todas as etapas do processo de extração de hidrocarbonetos por soxhlet descritas anteriormente, podem ser encontradas diferentes condições de trabalho, mesmo partindo de um método padrão. A Tabela 7 a seguir ilustra essas diferenças, em alguns trabalhos descritos na literatura.

Tabela 7: Diferentes condições descritas na literatura para as etapas de extração, concentração e *cleanup*.

Referência	Condições utilizadas		
	Extração	Concentração	Cleanup
	Tempo/solvente	Procedimento	Solventes de eluição
Tolosa <i>et al.</i> , 2004	8 h hexano:DCM ^a	Rotaevaporador + N ₂	Alifáticos:hexanoHPA: hexano/DCM (1:1)
Richter <i>et al.</i> , 2006	24 h DCM:acetona	Kuderna-Danish	Não descrito
Crespo e Yuist 2006	7h hexano: DCM	Rotaevaporador	Extração em fase sólida SPE
Luz <i>et al.</i> , 2010/	16 h hexano:acetona	N ₂	Alifáticos: hexano HPA: hexano/DCM(1:5)

^a DCM = diclorometano.

Os dados descritos na tabela acima, bem como todos os relatos feitos anteriormente, evidenciam a existência de uma falta de consenso nos procedimentos analíticos envolvendo as etapas de extração de poluentes orgânicos de matrizes ambientais, a concentração do extrato, assim como a etapa de *cleanup*, mesmo nos casos onde os protocolos são validados internacionalmente e são igualmente reconhecidos como sendo de referência (Jardim e Sodré, 2009).

Diante desses aspectos, nesse trabalho foram avaliadas as possíveis etapas críticas envolvidas na determinação de hidrocarbonetos alifáticos e HPA por sistema soxhlet, buscando-se com isso conseguir a melhoria de um método já validado. Além disso, pretende-se estudar a extração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por ultrassom.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Aperfeiçoar o protocolo analítico de determinação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos presentes em amostras ambientais, tais como sedimentos de ambientes aquáticos continentais e costeiros, notadamente com relação às etapas de extração e de fracionamento (*cleanup*).

2.2 Etapas do Trabalho

Com base no objetivo geral descrito anteriormente, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Avaliação da eficiência das etapas de extração dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos através de sistema soxhlet e ultrassom, para efeito de comparação;
- Avaliação da etapa de concentração dos analitos
- Avaliação do processo de *cleanup*, com relação à quantidade e polaridade de solventes utilizados para eluição dos compostos no processo de fracionamento em coluna cromatográfica;
- Validação do método otimizado por meio da avaliação de parâmetros de mérito, tais como linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão.
- Avaliação qualitativa e quantitativa do total de hidrocarbonetos de petróleo (THP), hidrocarbonetos alifáticos (n-alcanos e isoprenóides), mistura complexa não resolvida (UCM) e HPA.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de pureza adequada (grau HPLC) para a determinação de concentrações traço dos compostos estudados. Os solventes acetona, diclorometano (DCM) e hexano foram adquiridos da Mallinckrodt Inc. (EUA). A alumina e o cobre foram adquiridos da J.T. Baker Inc. (EUA). O detergente extran neutro, a sílica e o sulfato de sódio foram adquiridos da Merck (Brasil). Os padrões de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e seus respectivos padrões internos e subrogados foram adquiridos da AccuStandard Inc. (USA).

3.2 Limpezas de Vidrarias

Todas as vidrarias empregadas foram submetidas, previamente, a um procedimento de limpeza, visando evitar a contaminação das amostras, o que poderia

interferir nos resultados. Primeiramente, as vidrarias foram deixadas em banho de detergente (extran a 5% v/v) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada em água corrente, água destilada, água ultrapura (do tipo milli-Q), acetona e por fim mantidas em forno mufla à 450°C por um período de 4 horas.

3.3 Preparo dos Sedimentos

As amostras de sedimento utilizadas nesse estudo foram previamente coletadas e congeladas em refrigerador até sua utilização. O procedimento de manipulação e preparo da amostra foi executado de maneira a preservar sua integridade. Anteriormente às análises, o sedimento foi descongelado até temperatura ambiente, transferido para uma bandeja de alumínio e coberto com papel alumínio (previamente perfurado), sendo deixado em estufa a 30°C até a secagem. Após a remoção de galhos, pedras e outras impurezas presentes no sedimento, a amostra foi moída em almofariz e peneirada (peneira ABNT 0,149 mm) (Leite *et al.*, 2008), sendo então armazenada em frascos de vidro e deixada em dessecador até o momento da extração.

3.4 Extração por Ultrassom

A extração dos hidrocarbonetos por ultrassom foi realizada de acordo com o método 3550C da EPA (U.S. EPA, 2007). Neste procedimento, uma porção de 4 g de sedimento seco foi misturada com 4 g de sulfato de sódio, o qual foi previamente calcinado em mufla a 450°C por 4 horas (para eliminação de água remanescente e impurezas), em um erlenmeyer de 125 mL. A essa mistura foi adicionado 2 g de cobre ativado com HCl 6 mol L⁻¹ e lavado com diferentes solventes (metanol; metanol:DCM 1:1; DCM), a fim de eliminar o enxofre molecular que é um interferente na determinação de hidrocarbonetos, particularmente em sedimentos (Criteria Working Group, 1998; U. S. EPA 3660).

Com o objetivo de avaliar o processo de extração, foram adicionados padrões subrogados, sendo adicionadas as parafinas deuteradas (n-C_{20d}, n-C_{24d} e n-C_{30d}) na concentração de 2 µg mL⁻¹ para a fração alifática e *p*-terfenil-*d*¹⁴ na concentração de 100 ng mL⁻¹ para a fração aromática. Em seguida, inseriu-se um volume de 50 mL da mistura de solventes hexano:acetona (1:1) e o frasco foi devidamente vedado, para

evitar perdas de compostos durante a extração. Foram feitas extrações de três ciclos de 15 e de 60 minutos. Ao final de cada ciclo, o frasco foi deixado em geladeira por 40 minutos para decantação do sedimento. Em seguida o sedimento foi filtrado e o sobrenadante separado, sendo adicionado ao sedimento um novo volume de 50 mL da mistura de solventes. O volume total de sobrenadante obtido ao final dos três ciclos foi reduzido a aproximadamente 2 mL em um rotaevaporador para posterior realização do *cleanup*.

3.5 Extração por Soxhlet

A extração dos hidrocarbonetos por soxhlet foi feita de acordo com o método 3540C da EPA (U.S. EPA, 1996). O cartucho de celulose utilizado para o armazenamento da amostra, e demais materiais necessários para a extração dos compostos de interesse, foi previamente descontaminado em refluxo com DCM por um período de 6 horas. Após a etapa de limpeza, uma porção de 4 g de sedimento foi misturada com 4 g de sulfato de sódio e 2 g de cobre ativado dentro do cartucho. Foram adicionados também os padrões subrogados de alifáticos e HPA, para se avaliar a eficiência do processo de extração. Os hidrocarbonetos foram extraídos através do refluxo com hexano:acetona (1:1) por um período de 4, 6 e 8 horas, sendo o volume obtido reduzido a 2 mL em rotaevaporador para posterior fracionamento (*cleanup*).

3.6 Cleanup

O fracionamento dos hidrocarbonetos foi feito em coluna de vidro (Figura 4), previamente descontaminada com hexano. Para reter a fase sólida, um chumaço de lã de vidro calcinado foi introduzido no fundo da coluna. Em seguida, foram transferidos 10 g de sílica (ativada a 160°C por 16 horas e desativada com 2% (m/m) de água milli-Q), 1 g de alumina (calcina a 450°C por 4 horas e desativada com 2% (m/m) de água milli-Q), 600 mg de sulfato de sódio (calcina a 450°C por 4 horas) e 120 mg de cobre ativado. O extrato a ser fracionado foi transferido com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, sendo o balão lavado repetidas vezes com o solvente apropriado para cada eluição. Para a remoção da fração de alifáticos, foi feita inicialmente uma eluição com 50 mL de hexano. Em seguida, a eluição da fração contendo os HPA foi realizada com uma mistura de 75 mL de hexano:DCM (3:2). As duas frações coletadas tiveram seu

volume reduzido a aproximadamente 2 mL em rotaevaporador e concentrados até 1 mL com N_2 para posterior determinação da concentração por cromatografia.



Figura 4. Coluna utilizada no *cleanup* empacotada com a) Na_2SO_4 , b) alumina e c) sílica.

3.7 Avaliação das Etapas de Concentração, Extração e *Cleanup*

Para avaliar as perdas de compostos durante o processo de concentração da amostra, inicialmente, foram feitos testes de recuperação adicionando-se padrão a misturas de solventes. Nessa etapa foi adicionado solução padrão de HPA na concentração de 960 ng mL^{-1} em uma mistura de 180 mL de hexano:acetona (1:1). Após a redução do volume a aproximadamente 2 mL e concentração em fluxo de nitrogênio (N_2) a 1 mL determinou-se a concentração dos compostos por cromatografia em fase gasosa. Para avaliar a influência da temperatura, repetiu-se o teste anterior, entretanto com um novo sistema, onde se substituiu a água da torneira a temperatura ambiente por um banho de gelo para o resfriamento do sistema de rotaevaporação (Figura 5). O mesmo teste foi realizado para os hidrocarbonetos alifáticos, adicionando-se solução $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão de alifáticos em um volume de 180 mL de hexano:acetona (1:1) e o volume foi reduzido e concentrado a 1 mL, sendo os compostos determinados por cromatografia.

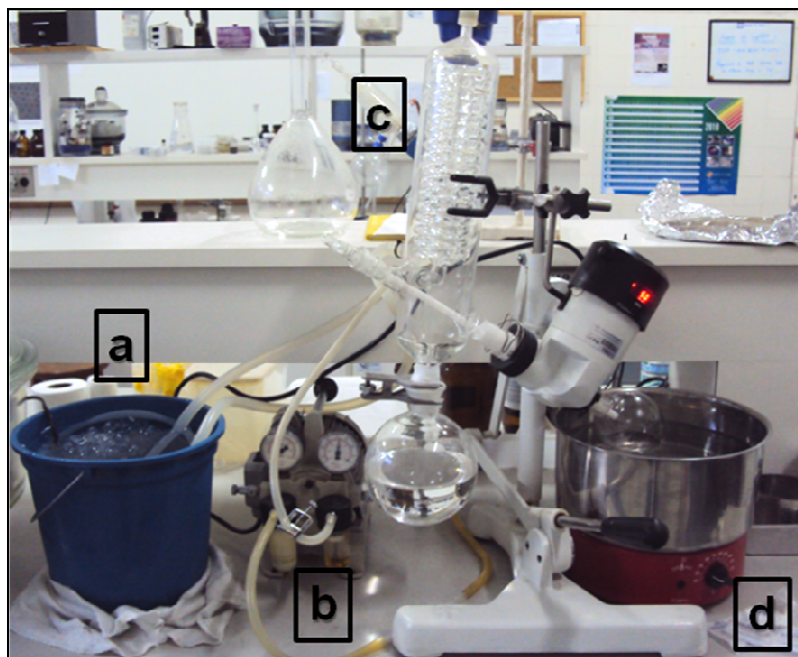


Figura 5. Sistema de rotaevaporação utilizado na etapa de concentração com a) banho de gelo, b) bomba de vácuo, c) condensador e d) sistema de aquecimento.

A etapa de concentração dos hidrocarbonetos foi também avaliada com relação ao método de concentração dos analitos após a redução de volume em rotaevaporador. Nessa etapa, soluções contendo 48 ng mL^{-1} de padrão de HPA e $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão de alifáticos foram misturadas (1 mL de cada em um balão de 2 mL) e transferidas para balão de fundo chato contendo diferentes misturas de solventes. Em um primeiro teste o solvente foi evaporado até a secura e os analitos recuperados com 1 mL de hexano:DCM (1:1), para posterior determinação. Em seguida, fizeram-se outros testes, a fim de avaliar a influência do fluxo de N_2 na concentração e o número de lavagens do balão contendo o extrato. Para isso, a primeira avaliação consistiu em redução do volume de solvente a aproximadamente 2 mL em rotaevaporador e concentração até 1 mL sob fluxo de N_2 com pressão 2 kgf cm^{-2} sem a lavagem do balão e utilizando uma pressão de $0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, lavando o balão três vezes com o solvente apropriado. Em outra avaliação, o volume de solvente foi concentrado até 1 mL somente no rotaevaporador.

Na etapa de extração no sistema soxhlet foi verificada a perda dos compostos durante o refluxo. Para isso foram feitos testes adicionando-se solução de 500 ng mL^{-1} de padrão de HPA em uma mistura de 180 mL de hexano:acetona (1:1) e fez-se uma simulação de extração por soxhlet durante 8 horas de refluxo. O volume obtido foi reduzido a 1 mL em rotaevaporador e a concentração dos compostos foi determinada

por cromatografia. O mesmo teste foi realizado para os alifáticos, com a adição de solução padrão de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Outra etapa verificada foi o *cleanup*, onde foram realizados diversos experimentos para determinação do total de hidrocarbonetos de petróleo (THP) e para o fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Para avaliar a eficiência desta etapa na determinação dos THP, foram feitos vários testes usando-se uma mistura de 2 mL de solução padrão de 200 ng mL^{-1} de HPA e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alifáticos. Essa solução foi adicionada a uma coluna contendo 8 g de sílica e 1 g de alumina, previamente ativadas, sendo alteradas a polaridade e a quantidade de solvente utilizada na eluição dos compostos. Após a eluição dos THP, o volume coletado foi reduzido até 1 mL, sendo os mesmos determinados por cromatografia.

Para o fracionamento dos hidrocarbonetos alifáticos e HPA, foram feitos vários testes com uma mistura de 2 mL de solução padrão de 48 ng mL^{-1} de HPA e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alifáticos. Esta solução foi transferida para uma coluna contendo 8 g de sílica e 1 g de alumina, ambas previamente ativadas. Foram testadas diferentes quantidades de solvente para a fração de alifáticos (F_1) e diferentes polaridades para a mistura de solventes utilizada na fração de aromáticos (F_2). As duas frações obtidas foram coletadas em balões diferentes e os volumes foram reduzidos até 1 mL, sendo os compostos determinados por cromatografia.

3.8 Teste de Adição e Recuperação de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos

Os testes de adição e recuperação foram realizados através de adição de solução padrão de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sulfato de sódio. Foi adicionada solução padrão de 150 ng mL^{-1} de HPA e solução de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alifáticos em um cartucho de celulose contendo 4 g de sulfato de sódio. Foram adicionados também os padrões subrogados de alifáticos e HPA. Os compostos foram então extraídos por soxhlet com 200 mL de DCM, dos quais 50 mL foram adicionados direto ao extrator contendo o cartucho de celulose, de modo que a interação entre o solvente e os analitos se iniciasse antes que os 150 mL restante, que foram colocados no balão, comesse a condensar. O sistema foi deixado em refluxo por um período de 4 horas, controlando o sistema para que realizasse 6 ciclos de extração por hora, visando obter melhores recuperações. O extrato obtido foi reduzido a 2 mL em rotaevaporador para posterior fracionamento, conforme descrito na etapa de *cleanup*.

3.9 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos de Material de Referência

Nesta etapa foi utilizado um material de referência com concentração conhecida de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Esse sedimento foi preparado e fornecido pelo Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais – PUC/RJ, tendo sido utilizado em diversos processos de intercalibração entre diversos laboratórios do Brasil. Em um cartucho de celulose, previamente descontaminado, foi adicionada uma porção de 4 g de sedimento e 2 g de cobre ativado, sendo adicionados também os padrões subrogados de HPA e alifáticos, nas concentrações de 150 ng mL^{-1} e $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os hidrocarbonetos foram extraídos por meio de refluxo com DCM por um período de 4 horas. O extrato obtido foi reduzido a 2 mL em rotaevaporador para posterior fracionamento.

3.10 Controle e Garantia de Qualidade

Foram feitas também algumas análises de controle de qualidade com o objetivo de monitorar e controlar possíveis fontes de contaminação durante as etapas efetuadas. Foram realizados brancos do processo de extração com amostras de sulfato de sódio (calcinado à 450°C), sendo que o extrato obtido nesta extração passou por todas as etapas que as amostras analisadas passaram. Além disso, verificou-se a possibilidade de contaminação na etapa de concentração da amostra. Para isso, adicionou-se em um balão 180 mL de hexano, após redução do volume no rotaevaporador até aproximadamente 1 mL, o volume obtido foi injetado para determinação de possíveis contaminantes. Outra possível fonte de contaminação investigada foi o nitrogênio utilizado na concentração. Para isso, um volume de aproximadamente 2 mL, foi reduzido até 1 mL sob fluxo de N_2 e depois injetado no cromatógrafo.

3.11 Determinação dos Hidrocarbonetos por Cromatografia em Fase Gasosa

Antes dos testes envolvendo as etapas de extração, foi realizado um processo de otimização para encontrar as melhores condições operacionais, visando obter boa resolução e separação dos picos. A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi feita com base nos seus respectivos tempos de retenção, através de injeção de padrão contendo uma mistura de alifáticos (C_{10} a C_{40}), além dos isoprenóides pristano

e fitano (Figura 6). Foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tendo como padrão interno o hidrocarboneto deuterado hexadecano ($\text{C}_{16\text{d}}$). Foi construída também uma curva de calibração para os hidrocarbonetos subrogados ($\text{C}_{20\text{d}}$, $\text{C}_{24\text{d}}$ e $\text{C}_{30\text{d}}$) na faixa de concentração de 1 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As curvas obtidas foram utilizadas para a obtenção do fator de resposta (FR), conforme equação abaixo.

$$FR_X = \frac{\text{Área}_x \times \text{Concentração}_{16\text{d}}}{\text{Concentração}_x \times \text{Área}_{16\text{d}}}$$

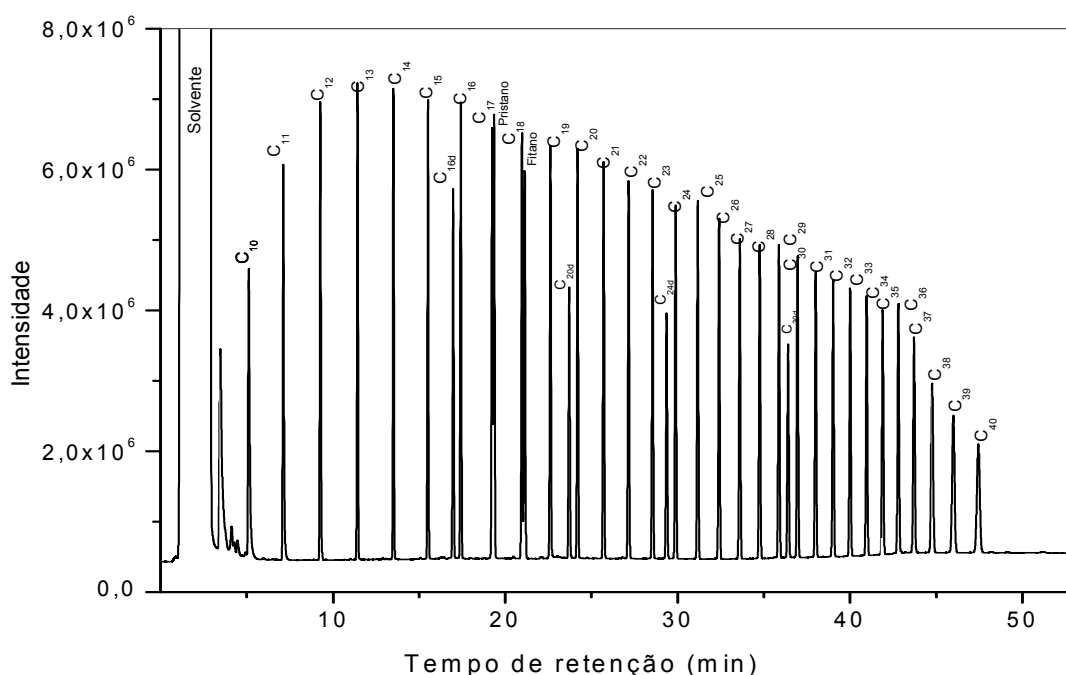


Figura 6: Perfil cromatográfico de solução padrão de alifáticos (C_{10} a C_{40}), e dos isoprenóides pristano e fitano.

A determinação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC), utilizando os parâmetros operacionais abaixo (Tabela 8).

Tabela 8: Parâmetros operacionais usados para a determinação dos alifáticos.

Equipamento	CG-DIC (<i>Thermo Electron Corporation</i>) modelo Focus, acoplado a um autoamostrador AS 3000 (<i>Thermo Electron Corporation</i>)	
Coluna	OV-5 (<i>Ohio Valley</i>) 30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm	
Gases	Arraste: N_2 3,0 mL min^{-1} (fluxo constante)	
	Gas saver: 20 mL min^{-1}	Make up: 30 mL min^{-1}
	Detector: Ar: 350 mL min^{-1}	H_2 : 35 mL min^{-1}
Temperaturas	Coluna 60°C (1,5 min), Taxa 6°C min^{-1} até 310°C (30 min)	
	Detector: 300°C	Injetor: 280°C (<i>splitless</i>)

Para os HPA a identificação dos compostos foi feita através de injeção de padrão contendo uma mistura de 16 HPA e consulta a biblioteca NIST do equipamento, com base nos seus íons de quantificação. A curva foi feita na faixa de concentração de 9,6 a 500 ng mL⁻¹ utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12, perileno-d12). Foi construída também uma curva de calibração para o padrão subrogado *p*-terfenil-*d*14 na faixa de concentração de 9,6 a 200 ng mL⁻¹. Os íons de quantificação dos 16 HPA, assim como o dos seus respectivos padrões interno e do *p*-terfenil-*d*14, e os tempos de retenção encontram-se descritos na Tabela 9 e figura 7 respectivamente.

Tabela 9: Íons de quantificação dos 16 HPA, padrões interno e *p*-terfenil-*d*14.

Padrão	Íon de quantificação	Padrão Interno	Íon de quantificação
Naftaleno (Naf)	128	Naftaleno-d8	136
Acenaftileno (Aci)	152	Acenafteno-d10	162
Acenafteno (Ace)	154	Acenafteno-d10	162
Fluoreno (Flu)	166	Acenafteno-d10	162
Fenantreno (Fen)	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno (Ant)	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno (Fla)	202	Fenantreno-d10	188
Pireno (Pir)	202	Criseno-d12	240
Benzo(a)antraceno (BaA)	228	Criseno-d12	240
Criseno (Cris)	228	Criseno-d12	240
Benzo (b+k)fluoranteno (BbkF)	252	Perileno-d12	240
Benzo(a)pireno (BaP)	252	Perileno-d12	264
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)	276	Perileno-d12	264
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	278	Perileno-d12	264
Benzo(g,h,i)perileno (Bghip)	276	Perileno-d12	264
<i>p</i> -terfenil- <i>d</i> 14	244	Criseno-d12	244

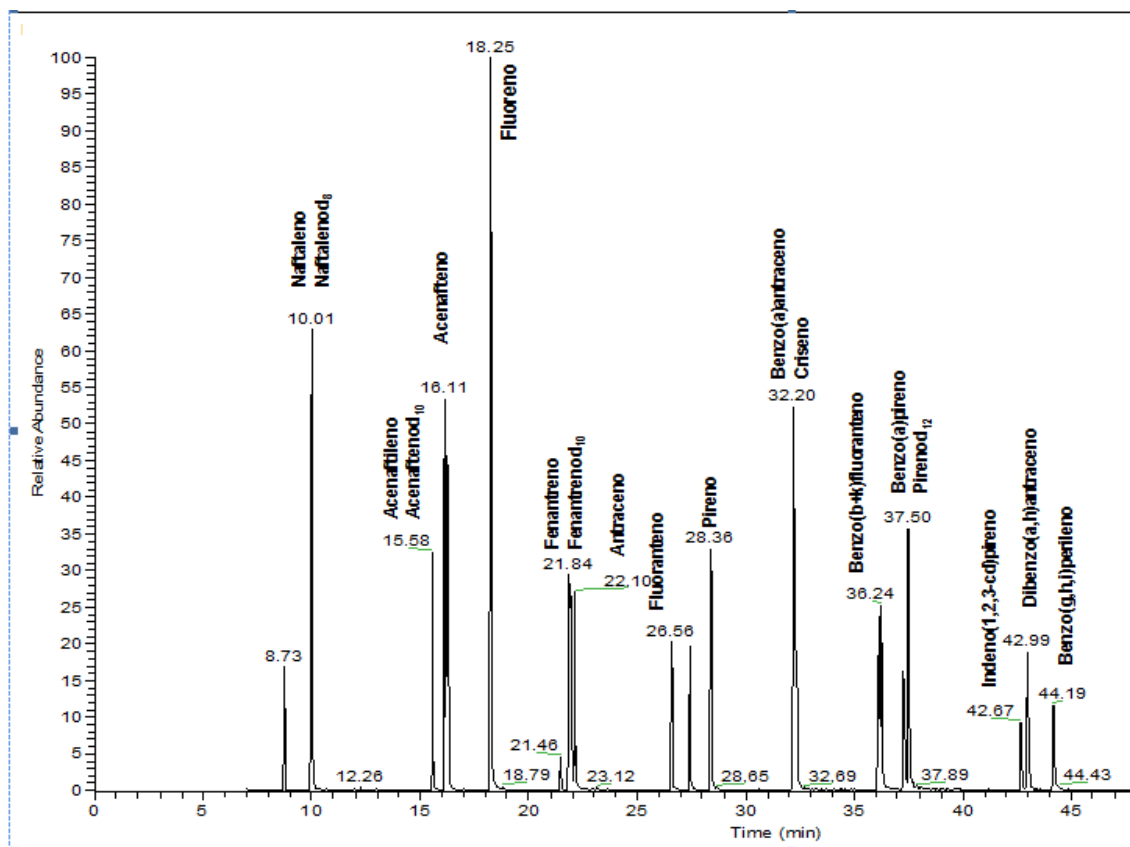


Figura 7: Perfil cromatográfico de solução padrão contendo os 16 HPA, padrão interno e seus respectivos tempos de retenção.

A determinação dos HPA foi realizada por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) utilizando os parâmetros operacionais abaixo (Tabela 10).

Tabela 10: Parâmetros operacionais usados para a determinação dos HPA.

Equipamento	CG-EM (<i>Thermo Electron Corporation</i>) modelo Focus-PolarisQ, acoplado a um autoamostrador AS 3000 (<i>Thermo Electron Corporation</i>)	
Coluna	OV-5ms (Ohio Valley) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	
Gases	Arraste: He 1,0 mL min ⁻¹ (vazão constante) - Gas saver: off	
Temperaturas	Coluna 50°C (5 min), rampa 1: 5°C min ⁻¹ até 230°C, rampa 2: 2°C min ⁻¹ até 250°C, rampa 3: 5°C min ⁻¹ até 300°C (8 min)	
	Detector: 300°C	Injetor: 250°C (<i>splitless</i>)
	Linha de Transferência: 250°C	Fonte de íons: 250°C
	Scan 1 (5min): (m/z 128, 136, 152, 154, 162, 164, 166, 178)	
Modo MSI ^a	Scan 2 (30min): (m/z 178, 202, 228, 244)	
	Scan 3 (47min): (m/z 228, 236 240, 252, 260, 264, 276, 277, 278, 279)	

^aMSI = Monitoramento seletivo de íons.

4. Resultados e Discussão

4.1 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos por Ultrassom

A Tabela 11 mostra os valores de concentração de alifáticos obtidos ultrassom, com 3 ciclos de 15 e de 60 minutos. Foi realizada apenas a quantificação dos alifáticos, pois o processo de quantificação dos hidrocarbonetos aromáticos ainda não estava otimizado quando se realizou esses experimentos.

Tabela 11: Concentrações de alifáticos obtidas nas extrações por ultrassom.

Composto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (3 ciclos de 15 minutos)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (3 ciclos de 60 minutos)
Dodecano (C_{12})	<0,024	<0,024
Tridecano (C_{13})	<0,031	<0,031
Tetradecano (C_{14})	<0,037	0,78
Pentadecano (C_{15})	<0,025	1,85
Hexadecano (C_{16})	<0,047	0,70
Heptadecano (C_{17})	<0,042	2,25
Pristano	<0,032	0,88
Octadecano (C_{18})	0,55	1,08
Fitano	<0,043	1,10
Nonadecano (C_{19})	<0,032	0,81
Eicosano (C_{20})	<0,031	3,84
Heneicosano (C_{21})	0,69	0,92
Docosano (C_{22})	0,59	1,26
Tricosano (C_{23})	1,19	8,44
Tetracosano (C_{24})	1,04	3,39
Pentacosano (C_{25})	3,73	10,51
Hexacosano (C_{26})	2,20	6,48
Heptacosano (C_{27})	4,94	11,57
Octacosano (C_{28})	3,15	8,98
Nonacosano (C_{29})	6,02	11,91
triacontano (C_{30})	2,42	8,93
n-Hentriacontano (C_{31})	5,83	10,93
Dotriacontano (C_{32})	1,54	5,27
Titriacontano (C_{33})	3,82	6,92
Tetratriacontano (C_{34})	0,53	2,84
Pentatriacontano (C_{35})	1,63	3,27
Hexatriacontano (C_{36})	<0,13	2,13

Heptatriacontano (C ₃₇)	<0,076	3,24
Octatriacontano (C ₃₈)	<0,091	25,30
Nonatriacontano (C ₃₉)	<0,108	<0,108
Tetracontano (C ₄₀)	<0,165	<0,165

Os resultados de concentração de hidrocarbonetos alifáticos para a extração de 60 minutos variaram de 0,70 a 25,30 µg mL⁻¹. Para extração por 15 minutos as concentrações dos compostos ficaram na faixa de 0,53 a 6,02 µg mL⁻¹. Observando os valores de concentração encontrados é possível notar que a extração realizada com ciclos de 60 minutos apresentou uma melhor eficiência do que a extração realizada com ciclos de 15 minutos. Este fato também foi confirmado pelos valores de recuperação do padrão subrogado (n-C_{20d}), que é um composto orgânico com propriedades físico-químicas e estrutura química semelhantes aos analitos de interesse. O cálculo de sua recuperação é feito para estimar perdas e/ou ganhos ao longo de todo processo e relaciona a quantidade de padrão adicionado no início de todas as etapas com a obtida ao final do processo (Lanças, 2004), tendo sido nesse ensaio determinado pela equação abaixo (método 8000B – U.S. EPA, 1996; Massone, 2004).

$$Recuperação (\%) = \frac{Área_{padrão\ subrogado} \times Concentração_{padrão\ interno} \times 100}{Concentração_{padrão\ subrogado} \times Área_{padrão\ interno}}$$

A partir dos percentuais de recuperação obtidos, mostrados na Tabela 12, é possível observar que a eficiência do processo de extração realizado com ciclos mais longos (32%) foi superior quando comparada com a extração com ciclos mais curtos (19%). No entanto, os valores de recuperação encontrados em ambos os processos estão muito abaixo dos níveis considerados satisfatórios, uma vez que os intervalos de recuperação aceitáveis para a determinação de compostos orgânicos traço, em geral, devem estar na faixa de 70-120% (Ribani *et al.*, 2004).

Tabela 12: Valores de recuperação para o padrão subrogado de n-alcenos.

Extração	Recuperação (%)
3 ciclos de 15 minutos	19
3 ciclos de 60 minutos	32

Segundo o método 3550C (U.S. EPA, 2007), a potência do banho ultrassônico recomendada para a realização de extração de hidrocarbonetos de petróleo é de 300 W. No entanto, a potência do equipamento utilizado nesse trabalho foi de 120 W, o que poderia explicar os baixos valores de recuperação encontrados. Além disso,

possíveis perdas de compostos podem estar ocorrendo durante as etapas de filtração, concentração e fracionamento, mostrando a necessidade de se aperfeiçoar cada uma dessas etapas individualmente. Sendo assim, como o sistema de filtração e o banho ultrassom disponível no laboratório não se mostraram adequados, podendo provocar perdas de compostos em ambas as etapas, resolveu-se não fazer novos testes com o ultrassom, passando-se para os estudos empregando apenas o sistema soxhlet.

4.2 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos por Sistema Soxhlet

4.2.1 Avaliação do Tempo de Extração

De acordo com Dean (1998), os tempos de extração dos compostos orgânicos utilizando sistema soxhlet podem variar de 6 a 24 horas, dependendo da quantidade de ciclos realizados durante 1 hora de extração, sendo recomendados de 4-6 ciclos por hora (U.S. EPA, 1996). Dessa forma, fez-se uma avaliação da extração nos tempos de 4, 6 e 8 horas. Os valores de recuperação para os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foram calculados com base nos padrões subrogados $n\text{-C}_{20d}$ e $p\text{-terfenil-}d_{14}$ respectivamente, e são apresentados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13: Valores de recuperação para os padrões subrogados de alifáticos e HPA, para os tempos de extração de 4, 6 e 8 horas.

Extração	Recuperação alifáticos (%)	Recuperação HPA (%)
4 horas	56	29
6 horas	60	28
8 horas	68	29

Os valores de recuperação para os alcanos nos tempos de 4, 6 e 8 horas foram 56%, 60% e 68% respectivamente, observando-se uma diminuição nos valores de recuperação conforme diminui o tempo de refluxo, mostrando que provavelmente é preciso um tempo mínimo para que a extração desses compostos seja eficiente. Já para os HPA, nos três tempos de refluxo utilizados, os percentuais de recuperação praticamente não variaram. Para as duas classes de compostos estudados, os resultados de recuperação empregando o sistema soxhlet ficaram abaixo do esperado, ou seja, foram inferiores a 70% (Ribani *et al.*, 2004). Isso demonstra que podem estar ocorrendo perdas nas diversas etapas do processo (extração, concentração e

cleanup), que podem estar influenciando mais na eficiência da extração do que o tempo de refluxo. Diante disso, foi feita uma avaliação mais detalhada dessas etapas separadamente, pois se as perdas nas etapas isoladas forem muito altas, isso acarretará em uma baixa eficiência no processo como um todo.

4.3 Avaliação das Etapas de Concentração, Extração e *Cleanup* através de Testes de Recuperação

Nesses testes não foram adicionados os padrões subrogados, os cálculos foram feitos com base na concentração do padrão adicionado, onde foi relacionada a quantidade de padrão adicionada no início com a obtida no final do teste. Como os hidrocarbonetos estudados são compostos considerados voláteis (Almeida, 2003), uma das causas de perdas de compostos ao longo do processo poderia ser por volatilização desses. Assim, foram feitos testes para avaliar a eficiência das etapas de concentração e extração, separadamente, as quais podem ser fontes deste tipo de perda. Além disso, a etapa de *cleanup* também foi avaliada, pois as possíveis perdas nesta etapa também podem se somar as outras, influenciando na recuperação dos compostos.

4.3.1 Etapa de Concentração

A obtenção de boas condições de trabalho nessa etapa é de grande relevância para o desenvolvimento do processo, uma vez que é realizada a concentração dos analitos após a extração e novamente após a etapa de *cleanup*. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, os valores de recuperação mais críticos foram para os HPA, assim, realizou-se primeiramente a avaliação para esses compostos. Fez-se primeiro um teste adicionando padrão à mistura de solventes e concentrando-se no mesmo sistema empregado nos experimentos descritos anteriormente. Em seguida, adaptou-se um sistema de resfriamento a serpentina do rotaevaporador utilizando um banho de gelo. Os resultados para esses testes são mostrados na Figura 8.

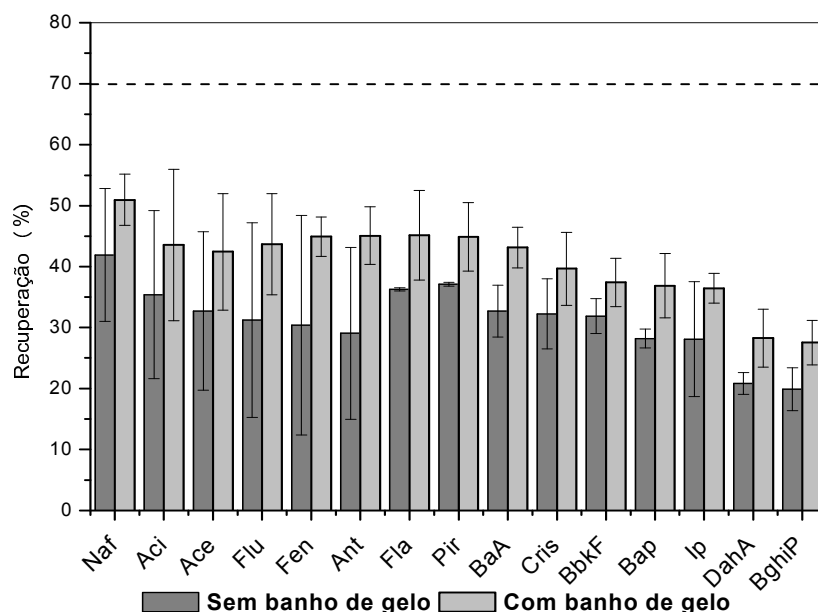


Figura 8. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração antes e após utilização do banho de gelo. (Linha pontilhada representa valor de recuperação mínimo aceitável)

De acordo com a Figura 8, bem como em todas que serão apresentadas, os HPA estão organizados por ordem crescente de número de anéis aromáticos, por isso observa-se uma diminuição da volatilidade da esquerda (Naf) para a direita (BghiP). De maneira geral, em ambos os testes podemos observar maiores valores de desvio padrão para os compostos mais voláteis e menores valores para os menos voláteis, indicando maior perda por volatilização para os HPA mais leves. Em relação aos percentuais de recuperação, os valores variaram de 19-41% sem a utilização do banho de gelo e de 27-51% utilizando o banho de gelo, sendo observados menores valores de desvio. Os valores de recuperação referentes ao segundo teste foram melhores, porém ainda abaixo do esperado (Ribani *et al.*, 2004). Todos esses dados demonstrando que com o novo sistema empregado, obteve-se uma melhora na recuperação dos compostos, além da reprodutibilidade nas medidas. Por outro lado, observou-se que o tempo de concentração até 1 mL também diminuiu consideravelmente, mostrando que o controle da temperatura aumentou a eficiência desta etapa, pois a menor temperatura na serpentina do rotaevaporador favoreceu o processo de condensação do solvente. Os testes de recuperação para os hidrocarbonetos alifáticos foram feitos somente usando o sistema de banho de gelo. Na Figura 9, bem como em todas que serão apresentadas, os hidrocarbonetos alifáticos estão organizados em ordem crescente de massa molar, o que confere uma

diminuição da volatilidade da esquerda (C_{10}) para a direita (C_{40}). Observam-se nessa uma melhor recuperação dos compostos mais leves ($C_{10} - C_{20}$) do que para os de massas molar intermediária ($C_{20} - C_{30}$), em função da diminuição da volatilidade conforme aumenta o número de carbonos na cadeia. Para os compostos de maior massa molar ($C_{30} - C_{40}$), essa tendência não é seguida em função de problemas de interação dos compostos com a coluna cromatográfica, que interfere na recuperação dos compostos. Os valores de recuperação para a etapa de concentração dos hidrocarbonetos alifáticos (Figura 9) ficaram entre 70-97%, sendo considerados aceitáveis (Ribani *et al.*, 2004).

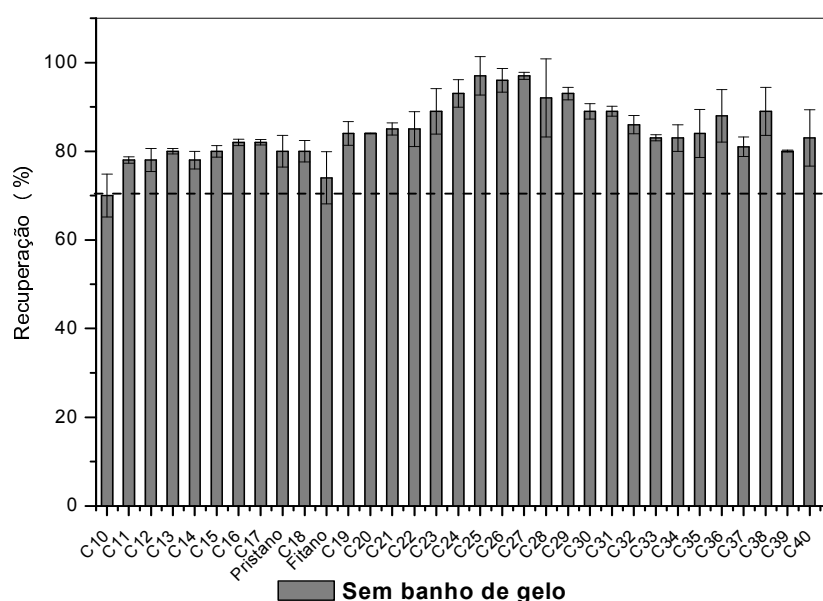


Figura 9. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão ($n=3$) na etapa de concentração após utilização do banho de gelo.

Os resultados apresentados nas Figuras 8 e 9 demonstram que apesar da implantação do sistema de resfriamento no rotaevaporador ter proporcionado uma melhora na recuperação dos compostos, por ter diminuído as perdas por volatilidade, estes ainda não foram considerados satisfatórios, principalmente para os HPA. Com o objetivo de obter resultados mais satisfatórios, avaliou-se também a influência da vazão de N_2 na recuperação dos compostos após a redução de volume em rotaevaporador. Dessa forma foram feitos dois testes sem a utilização de nitrogênio na concentração. No primeiro evaporou-se todo o solvente até a secura e os analitos foram recuperados da parede do balão com um 1 mL de solvente. No segundo teste realizou-se a redução do volume para 1 mL diretamente no rotaevaporador. Os valores

de recuperação para os hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos encontram-se nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

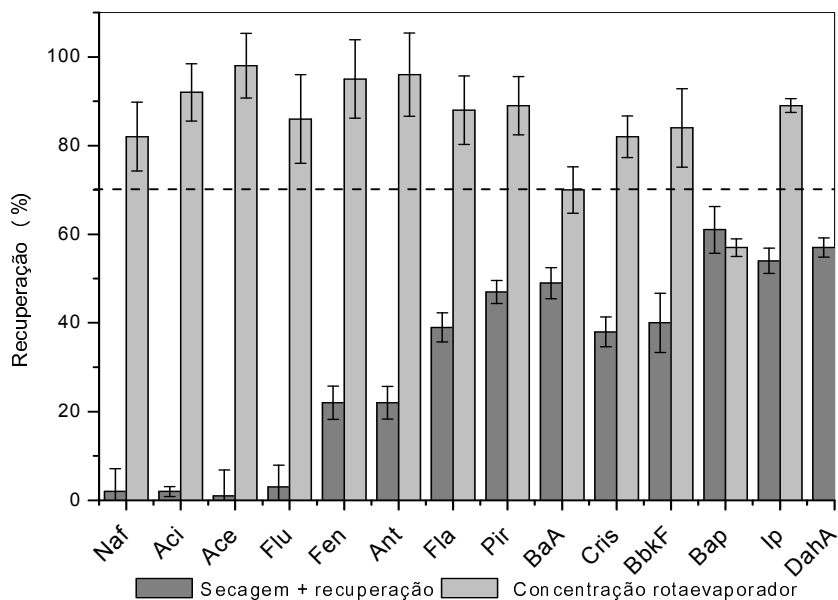


Figura 10. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração com a secagem total do solvente e recuperação dos analitos com hexano:DCM e concentração até 1 mL no rotaevaporador.

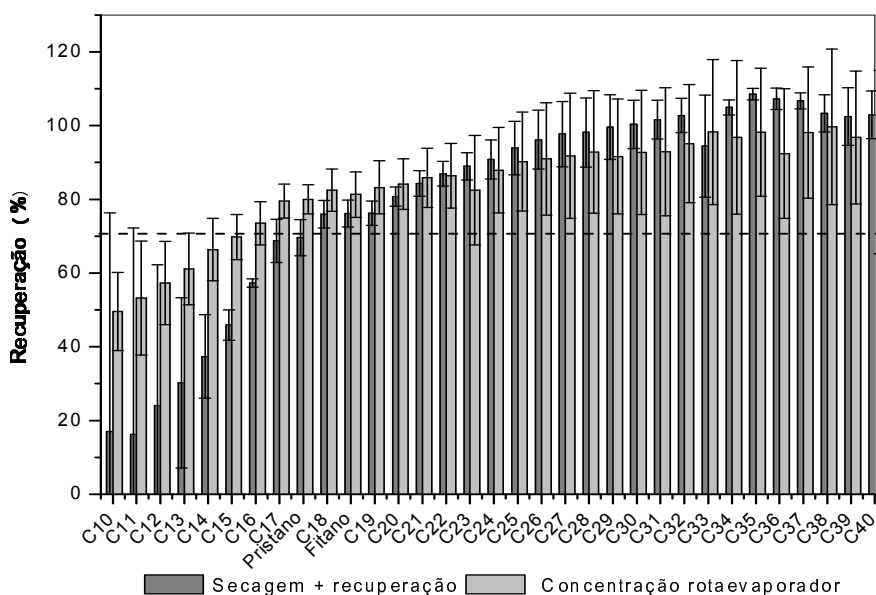


Figura 11. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração com a secagem total do solvente e recuperação dos analitos com hexano:DCM e concentração até 1 mL no rotaevaporador.

Com a secagem total do solvente a faixa de recuperação para os HPA e alifáticos variou de 2-82% e de 16-108%, sendo observada uma grande perda dos compostos, principalmente para os HPA com maior pressão de vapor, tais como naftaleno, acenafteno, e os alifáticos de cadeia mais curta (C_9 - C_{13}). Já com redução do volume até 1 mL somente no rotaevaporador, observa-se maiores valores de recuperação, na faixa de 50-97% para os HPA e de 49-99% para os alifáticos. Entretanto, observou-se que esse método foi o mais lento e mais propenso a erros, uma vez que é muito difícil acertar o volume exato de 1 mL, necessário para a correta quantificação dos analitos. Para realizar a concentração dos analitos apenas no rotaevaporador com mais precisão, seria necessário concentrar até 0,5 mL e depois completar o volume até 1 mL, o que poderia provocar a secagem do solvente, e consequente perda do analitos.

Em outra avaliação verificou-se a pressão do N_2 utilizado na concentração dos analitos e no processo de lavagem do balão contendo o extrato, de forma a garantir uma transferência quantitativa dos mesmos. Como não foi medido o valor da vazão, uma vez que essa pode variar em função do tamanho e diâmetro da mangueira utilizada, os resultados estão representados pela pressão de N_2 verificada no manômetro do cilindro. Os valores de recuperação de HPA e alifáticos desses testes encontram-se nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

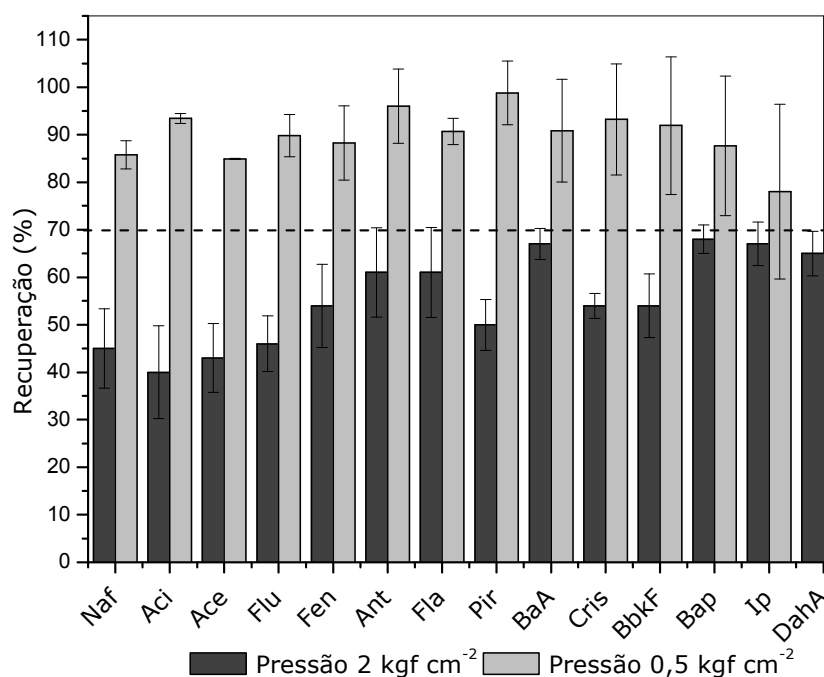


Figura 12. Percentuais de recuperação de HPA e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração utilizando nitrogênio com uma pressão de 2 kgf cm⁻² sem a lavagem do balão e utilizando nitrogênio com uma pressão de 0,5 kgf cm⁻² e 3 lavagens do balão.

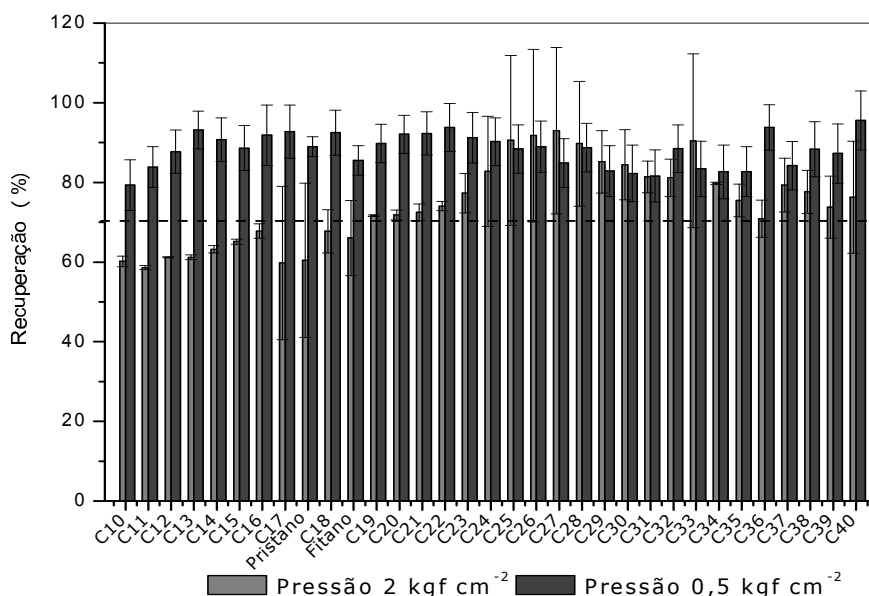


Figura 13. Percentuais de recuperação de alifáticos e estimativa de desvio padrão (n=3) na etapa de concentração utilizando nitrogênio com uma pressão de 2 kgf cm⁻² sem a lavagem do balão e utilizando nitrogênio com uma pressão de 0,5 kgf cm⁻² e 3 lavagens do balão.

Com a utilização de uma vazão maior de N₂ representada pela pressão de 2 kgf cm⁻² no manômetro do cilindro, sem a lavagem do balão, os valores de recuperação dos HPA foram de 40 a 68%, e para os alifáticos de 58 a 92%. Esses valores foram mais baixos do que com os testes utilizando uma pressão menor de nitrogênio de 0,5 kgf cm⁻², cujos valores variaram de 84 a 101% para os HPA e de 79 a 95% para os alifáticos. Essas informações indicam que a utilização de uma pressão maior de N₂, tanto para os alifáticos quanto para os aromáticos, faz com que a pressão no recipiente, onde os compostos estão sendo concentrados, diminua chegando próxima a pressão de vapor dos compostos, favorecendo a perda principalmente dos compostos mais voláteis. Pode-se dizer também que a lavagem do balão contendo os compostos permite uma melhor recuperação dos mesmos, em função de uma melhor transferência quantitativa. Apesar de terem sido mudadas duas variáveis ao mesmo tempo, a pressão e o número de lavagens, podemos inferir que a pressão tem uma contribuição relevante na recuperação dos compostos, uma vez que tanto para os alifáticos quanto para os aromáticos há uma diferença significativa na recuperação dos mais voláteis, já para os menos voláteis essa diferença existe, mas é menor. Diante desses aspectos, verificou-se que nas condições de trabalho desenvolvidas no laboratório, a redução do volume de solvente no rotaevaporador seguida da concentração com N₂ a uma pressão de 0,5 kgf cm⁻² é a mais apropriada.

4.3.2 Etapa de Extração

Como foram observadas perdas de analitos por volatilização na etapa de concentração, pode-se inferir que o mesmo problema poderia estar ocorrendo durante a extração em sistema soxhlet. Dessa forma, implantou-se também no sistema de condensação do soxhlet um banho de gelo para controlar a temperatura da água de refluxo (Figura 5). Os resultados de recuperação para os HPA e hidrocarbonetos alifáticos estão apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

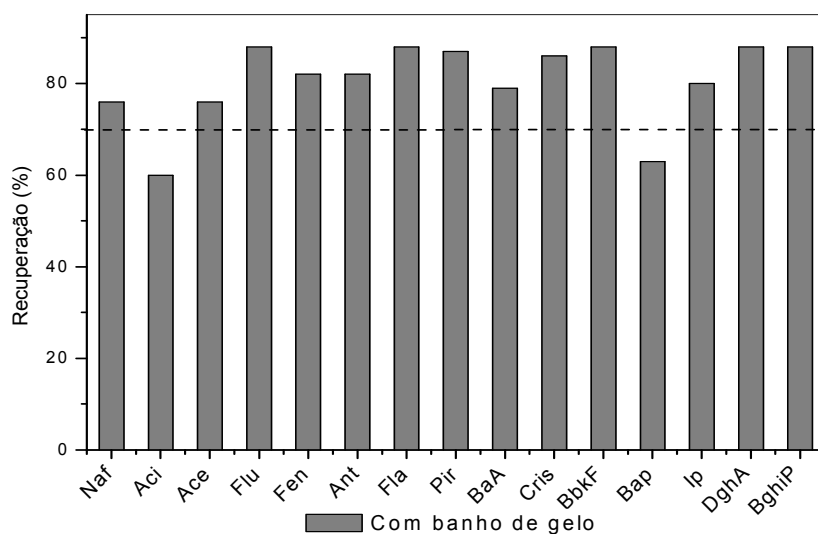


Figura 14. Recuperação de HPA após extração em soxhlet utilizando banho de gelo para resfriamento do condensador.

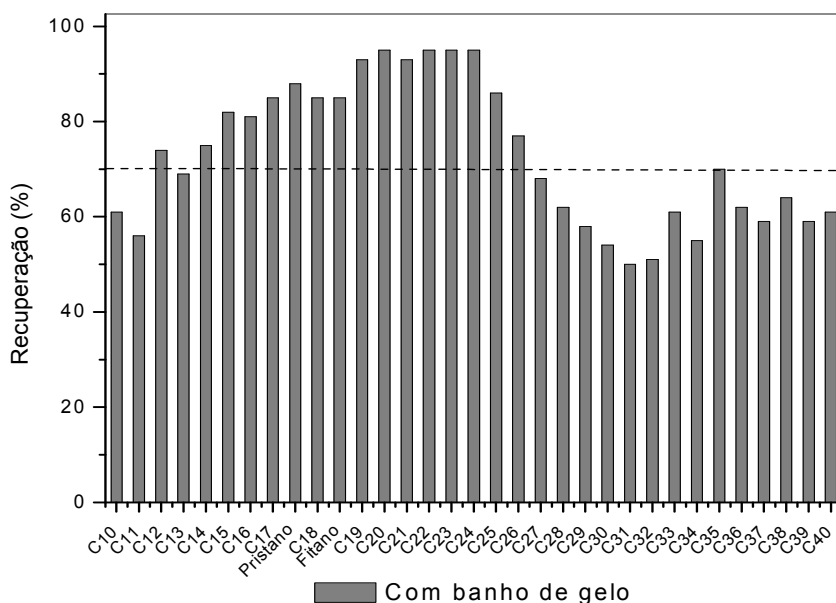


Figura 15. Recuperação de alifáticos após extração em soxhlet utilizando banho de gelo para resfriamento do condensador.

Os percentuais de recuperação para os compostos aromáticos e alifáticos foram de 60-88% e 50-95%, respectivamente. Os valores de recuperação na etapa de extração são em função de perda dos compostos por volatilização durante o processo, mas também devido às perdas envolvidas na etapa de concentração. No caso dos hidrocarbonetos alifáticos observa-se uma melhor recuperação para os compostos de massa molar intermediária, uma vez que os compostos de baixa massa molar são mais voláteis (Almeida 2003; Leite, 2008) e os compostos que eluem por último podem ser afetados por sangramento da coluna, que é o desprendimento da fase estacionária da coluna em função da alta temperatura da rampa de aquecimento, sendo caracterizado por uma elevação da linha base (Figura 16).

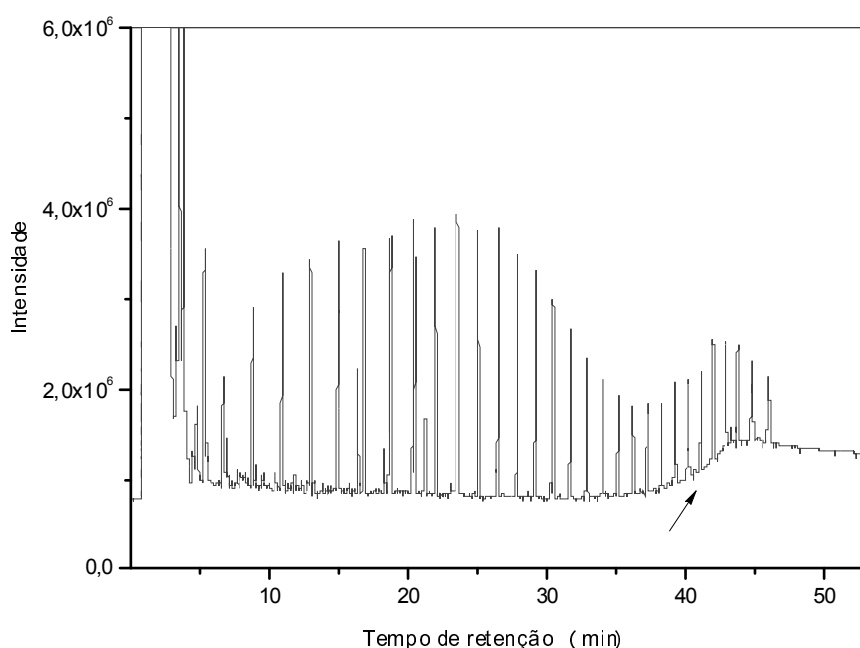


Figura 16. Cromatograma representativo do teste de extração dos alifáticos, ilustrando elevação da linha base.

4.3.3 Etapa de *Cleanup*

4.3.3.1 *Cleanup* para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (THP)

Os hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos são duas classes de compostos com polaridades distintas e a escolha correta do solvente de eluição tem um papel fundamental na recuperação desses compostos. A utilização de um solvente muito polar, por exemplo, pode favorecer a recuperação de uma determinada classe de compostos, mas resultar em baixa recuperação para a outra. Diante desses aspectos, foram avaliadas diferentes quantidades de solventes utilizadas na eluição das duas

classes de compostos durante o *cleanup* (Tabela 14). Os valores de recuperação para os alifáticos e HPA referentes a estes testes são apresentados na Tabela 15.

Tabela 14: Condições empregadas nos testes do *cleanup*.

<i>Cleanup</i>	Solventes de Eluição
A	F ₁ = 50 mL de hexano / F ₂ = 50 mL (30 hexano + 20 DCM)
B	F ₁ = 25 mL de hexano / F ₂ = 50 mL (30 hexano + 20 DCM)
C	F ₁ = 25 mL de hexano / F ₂ = 50 mL (25 hexano + 25 DCM)
D	F ₁ = 25 mL de hexano / F ₂ = 30 mL (15 hexano + 15 DCM)
E	F ₁ = 25 mL de hexano / F ₂ = 50 mL (20 hexano + 30 DCM)
F	F ₁ = 25 mL de hexano / F ₂ = 50 mL (20 hexano + 30 DCM)*

F₁: fração alifática; F₂: fração aromática; DCM: diclorometano; *repetição E.

Tabela 15: Faixas de recuperação obtidas para os alifáticos e HPA.

<i>Cleanup</i>	Faixa de Recuperação (%)	
	Alifáticos	HPA
A	51 – 114	35 – 61
B	60 – 134	23 – 65
C	86 – 113	47 – 90
D	77 – 120	39 – 86
E	64 – 99	67 – 108
F	66 – 98	63 – 94

Em relação a fração 1 (F₁), o objetivo era encontrar um volume de solvente que removesse todos os alifáticos da coluna. Já em relação a fração 2 (F₂), além de encontrar um volume que fosse suficiente para recuperar o HPA da coluna, era preciso encontrar uma mistura de solvente com polaridade adequada para essa remoção. Observa-se pela Tabela 15 que a redução do volume de solvente da F₁ no *cleanup* B em relação ao A proporcionou uma melhor recuperação dos compostos alifáticos. No entanto, para a F₂ a recuperação permaneceu baixa para esse teste. Uma das características dessa classe de compostos é sua maior polaridade em relação aos alifáticos (Chu e Chan, 2000), sendo necessária uma mistura de solventes com maior valor eluotrópico. No fracionamento C, para tentar melhorar a recuperação dos compostos aromáticos, aumentou-se o volume de diclorometano na F₂, o que resultou em uma melhora na recuperação dos HPA em relação aos testes anteriores. O fracionamento D foi realizado com o objetivo de diminuir o volume da mistura de solventes utilizados na F₂, mantendo a sua polaridade. Nesse teste, os valores de recuperação para HPA não se alteraram significativamente, porém observou-se uma

diminuição nos percentuais de recuperação para os alifáticos. Isso pode ser atribuído ao fato de que com a diminuição do volume da fração 2, acabou diminuindo a quantidade total de hexano usado em todo o *cleanup*, que é o solvente responsável pela remoção dos alifáticos da coluna. No teste E, resolveu-se aumentar um pouco mais a polaridade da F_2 , para tentar melhorar a recuperação dos HPA, porém mantendo-se o volume da mistura usada no fracionamento C (50 mL). Os resultados obtidos para esse teste foram considerados satisfatórios tanto para os compostos alifáticos quanto para os aromáticos, o que foi comprovado pela repetição desse teste (teste F). É importante ressaltar que os testes de *cleanup* também estão sujeitos às perdas que possivelmente podem ocorrer na etapa de concentração, pois os compostos precisam ser concentrados antes de injeção no cromatógrafo.

De acordo com todos os resultados descritos acima, podemos observar que o *cleanup* que resultou nos melhores valores de recuperação simultaneamente para os aromáticos e alifáticos, foi o teste E, sendo os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18 respectivamente.

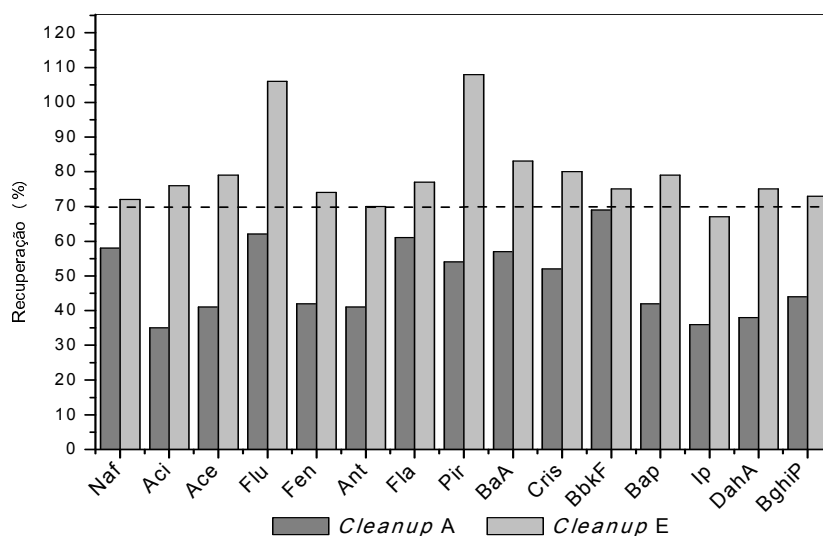


Figura 17. Comparação entre o *cleanup* mais eficiente (teste E: F_1 = 25 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) e o menos eficiente (teste A: F_1 = 50 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 30 mL hexano + 20 mL DCM) para os HPA.

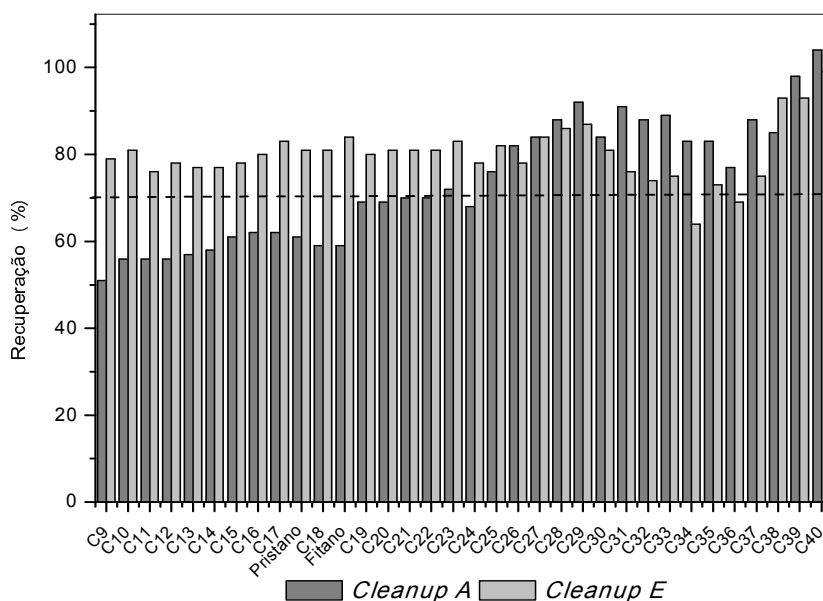


Figura 18. Comparação entre o *cleanup* mais eficiente (teste E: F_1 = 25 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) e o menos eficiente (teste A: F_1 = 50 mL de hexano e F_2 = 50 mL / 30 mL hexano + 20 mL DCM) para os alifáticos.

4.3.3.2 Fracionamento de Hidrocarbonetos Alifáticos e HPA

Nessa etapa do trabalho procurou-se encontrar uma condição que permitisse separar adequadamente os compostos alifáticos e aromáticos em suas frações distintas. Esses testes foram realizados por meio da determinação de ambas as classes de compostos, tanto na fração contendo os alifáticos (F_1) quanto na fração contendo os HPA (F_2), para avaliar a eficiência do processo de eluição separadamente. Os parâmetros estudados e os valores de recuperação obtidos para os HPA e hidrocarbonetos alifáticos estão apresentados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16: Condições empregadas nos testes do *cleanup*.

<i>Cleanup</i>	Solventes de Eluição
A	F_1 = 50 mL de hexano / F_2 = 50 mL (20 mL hexano + 30 mL DCM)
B	F_1 = 40 mL de hexano / F_2 = 50 mL (20 mL hexano + 30 mL DCM)

Tabela 17: Faixas de recuperação obtidas para os HPA e alifáticos.

<i>Cleanup</i>	Faixa de recuperação (%)	
	HPA	Alifáticos
A	40 - 95	51 - 94
B	71 - 107	76 - 119

Os baixos valores de recuperação encontrados para os HPA (35–61%) no *cleanup A* podem ser explicados pelo fato de uma parte desses compostos estarem sendo eluídos juntamente com a fração dos alifáticos conforme mostra a Figura 19. No *cleanup A*, também foi observada uma baixa recuperação para os compostos alifáticos mais voláteis, no entanto, nenhum composto foi eluído com a fração dos aromáticos (Figura 20).

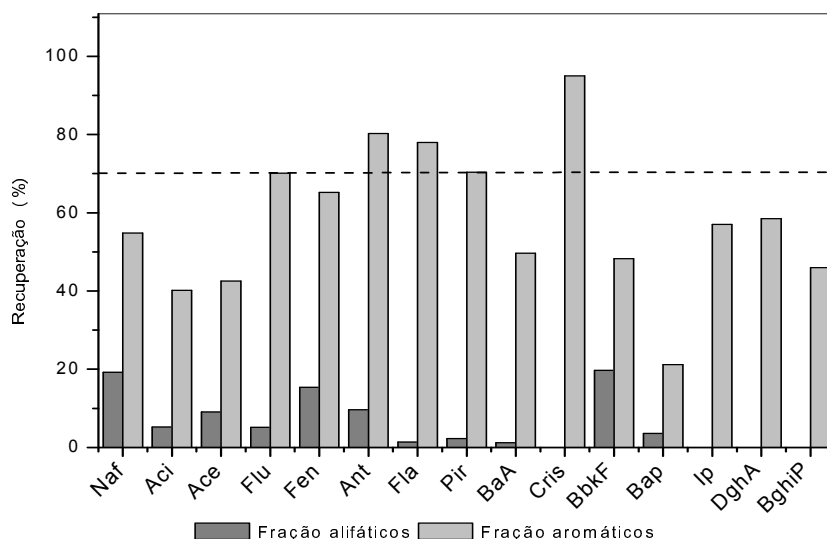


Figura 19. Recuperação de HPA nas frações F₁ (50 mL de hexano) e F₂ (50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) no *cleanup A*.

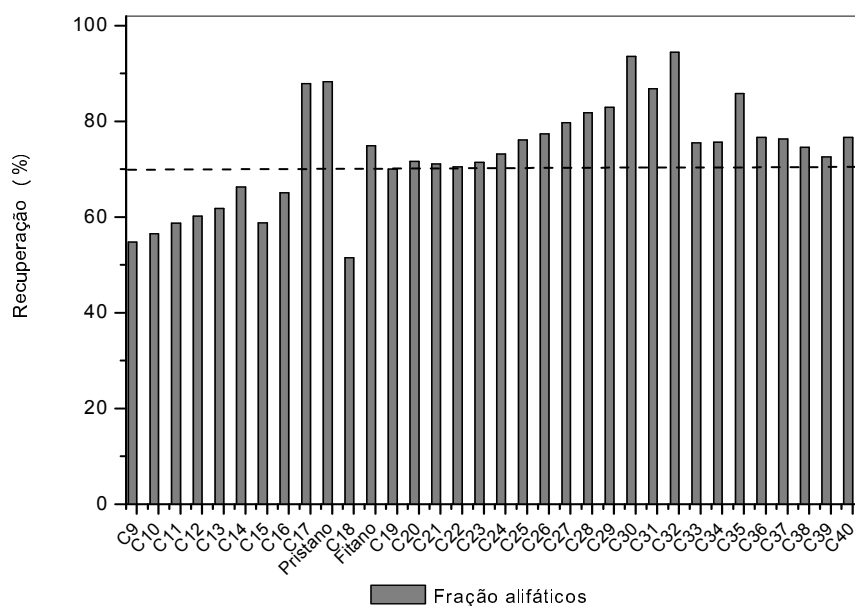


Figura 20. Recuperações de alifáticos nas frações F₁ (50 mL de hexano) e F₂ (50 mL / 20 mL hexano + 30 mL DCM) no *cleanup A*.

Para tentar melhorar a separação das duas classes de compostos, no *cleanup* B diminuiu-se o volume de solvente utilizado na F_1 para evitar que os HPA fossem eluídos juntamente com a fração dos alifáticos. Com a diminuição do volume na F_1 , não foram detectados mais HPA nessa fração, apenas na fração dos aromáticos, conforme apresentado na Figura 21.

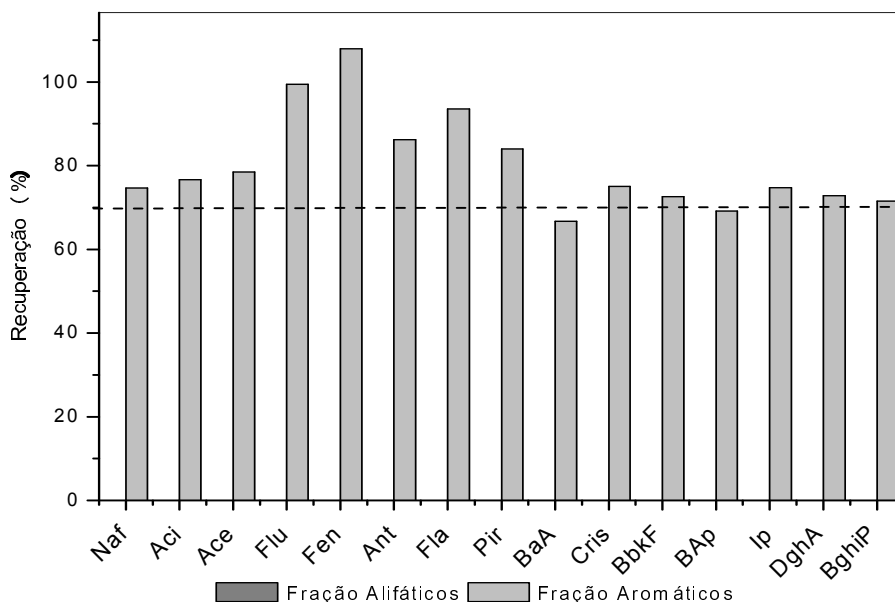


Figura 21. Recuperações de HPA nas frações F_1 (40 mL de hexano) e F_2 (50 mL /20 mL hexano + 30 mL DCM) no *cleanup* B.

De maneira geral, com a diminuição do volume de solvente na F_1 (alifáticos), houve uma melhora significativa na recuperação para ambos os compostos estudados (Figuras 22 e 23).

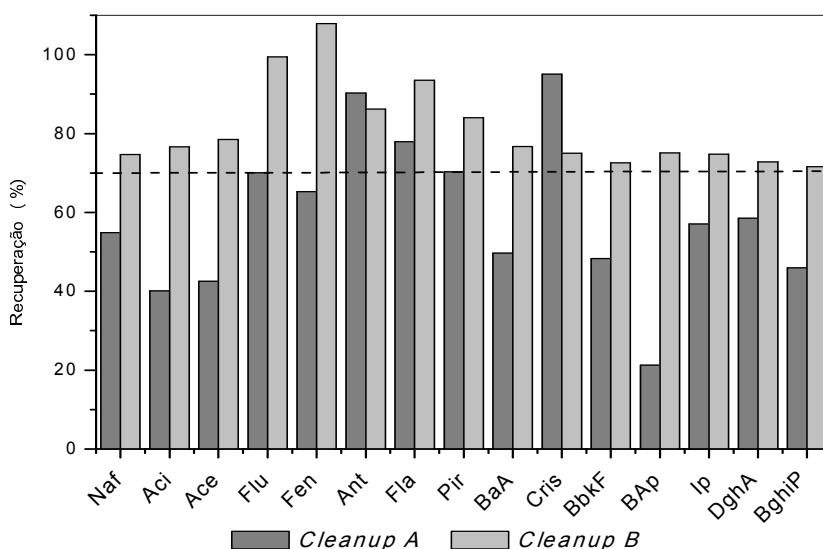


Figura 22. Comparação entre os resultados de recuperação de HPA obtidos com o *cleanup* A (F_1 = 50 mL de hexano) e *cleanup* B (F_1 = 40 mL de hexano).

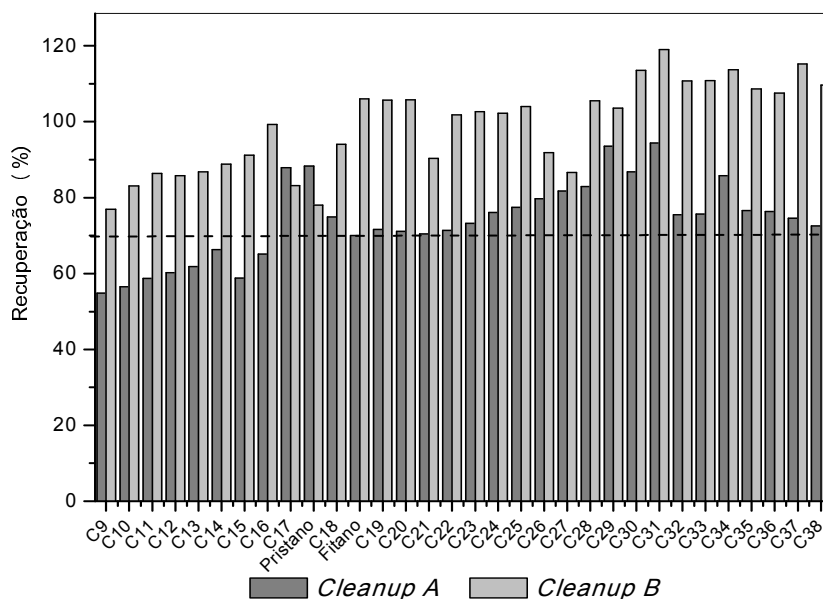


Figura 23. Comparação entre resultados de recuperação de alifáticos obtidos com o *cleanup* A ($F_1 = 50$ mL de hexano) e *cleanup* B ($F_1 = 40$ mL de hexano).

Os resultados obtidos mostram que o processo de otimização das etapas de concentração, extração e *cleanup* melhoraram consideravelmente a recuperação dos compostos. Além de mostrarem a existência de um grande número de variáveis que podem afetar os resultados. Na Tabela 18 estão descritas as melhores condições de trabalho encontradas para o desenvolvimento de cada etapa.

Tabela 18: Melhores condições encontradas para as etapas de extração, concentração e *cleanup*.

Etapa	Condição
Extração	Banho de gelo
Concentração	Banho de gelo Concentração com utilização de N_2 com pressão de $0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$
<i>Cleanup</i> (THP)	$F_1 = 25$ mL de hexano / $F_2 = 50$ mL (hexano:DCM 2:3)
<i>Cleanup</i> (Fracionamento de alifáticos e aromáticos)	$F_1 = 40$ mL de hexano / $F_2 = 50$ mL (hexano:DCM 2:3)

4.4 Validação do Método Otimizado

O procedimento de validação é essencial para implantação e consolidação de métodos desenvolvidos (INMETRO, 2003), sendo assim com o objetivo de validar o método otimizado nesse trabalho foram avaliados alguns parâmetros de mérito tais como linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão.

4.4.1 Linearidade

Através da linearidade é verificada a capacidade do método analítico de estabelecer uma relação direta, em uma determinada faixa de concentração, entre resultados que sejam proporcionais a concentração do analito na amostra com a resposta do equipamento. No caso desse trabalho, a correlação ocorre entre o valor de área do pico e a concentração, sendo a linearidade verificada por meio do coeficiente de correlação (R). Os valores de R obtidos para as curvas de HPA, cuja faixa de concentração foi de 9,6 a 500 ng mL⁻¹ (Tabela 19) e alifáticos 0,5 a 50 µg mL⁻¹ (Tabela 20) estão apresentados a seguir.

Tabela 19: Valores de R obtidos através da curva analítica dos 16 HPA e padrão subrogado *p*-terfenil-*d*14.

Composto	R
Naftaleno	0,9983
Acenaftileno	0,9984
Acenafteno	0,9988
Fluoreno	0,9977
Fenantreno	0,9976
Antraceno	0,9962
Fluoranteno	0,9951
Pireno	0,9989
Benzo(a)antraceno	0,9987
Criseno	0,9974
Benzo(b+k)fluoranteno	0,9965
Benzo(a)pireno	0,9962
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9985
Dibenzo(a,h)antraceno	0,9974
Benzo(g,h,i)perileno	0,9966
<i>p</i> -terfenil- <i>d</i> 14	0,9995

Tabela 20: Valores de *R* obtidos através da curva analítica de hidrocarbonetos alifáticos e padrões subrogados (n-C_{20d}, n-C_{24d} e n-C_{30d}).

Composto	R
Decano (C ₁₀)	0,9997
Undecano (C ₁₁)	0,9997
Dodecano (C ₁₂)	0,9993
Tridecano (C ₁₃)	0,9996
Tetradecano (C ₁₄)	0,9995
Pentadecano (C ₁₅)	0,9997
Hexadecano (C ₁₆)	0,9997
Heptadecano (C ₁₇)	0,9995
Pristano	0,9997
Octadecano (C ₁₈)	0,9997
Fitano	0,9998
Nonadecano (C ₁₉)	0,9998
Eicosano (C ₂₀)	0,9999
Heneicosano (C ₂₁)	0,9999
Docosano (C ₂₂)	0,9998
Tricosano (C ₂₃)	0,9998
Tetracosano (C ₂₄)	0,9998
Pentacosano (C ₂₅)	0,9998
Hexacosano (C ₂₆)	0,9998
Heptacosano (C ₂₇)	0,9996
Octacosano (C ₂₈)	0,9994
Nonacosano (C ₂₉)	0,9993
triacontano (C ₃₀)	0,9993
n-Hentriacontano (C ₃₁)	0,9995
Dotriacontano (C ₃₂)	0,9997
Titriacontano (C ₃₃)	0,9998
Tetratriacontano (C ₃₄)	0,9998
Pentatriacontano (C ₃₅)	0,9997
Hexatriacontano (C ₃₆)	0,9995
Heptatriacontano (C ₃₇)	0,9993
Octatriacontano (C ₃₈)	0,9992
Nonatriacontano (C ₃₉)	0,9989
Tetracontano (C ₄₀)	0,9986
Eicosano (n-C _{20d})	0,9992
Tetracosano (n-C _{24d})	0,9991
triacontane (n-C _{30d})	0,9966

A seguir são apresentadas as curvas analíticas obtidas por meio de injeções em triplicatas para o naftaleno e benzo(a)pireno (Figuras 24 e 25) e dodecano (C_{12}) e n-hentriacontano (C_{31}) (Figuras 26 e 27). Os demais compostos obtiveram curvas analíticas semelhantes a essas e não serão apresentadas.

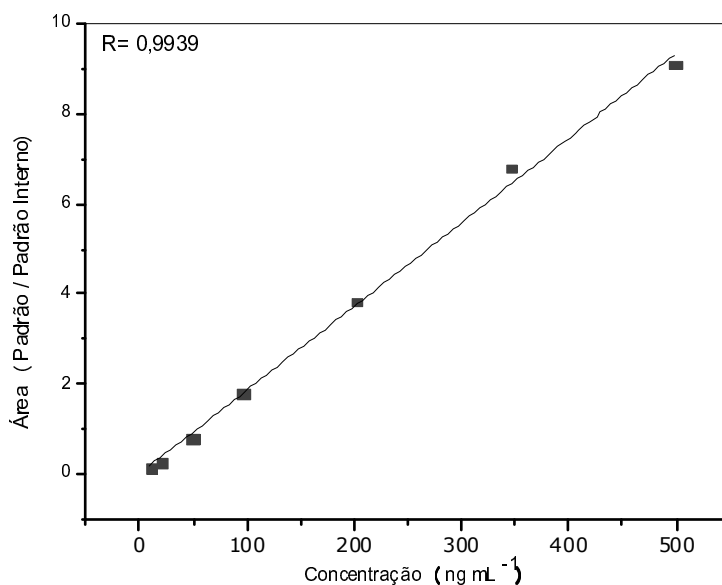


Figura 24. Curva analítica do naftaleno com seu valor de coeficiente de correlação (R).

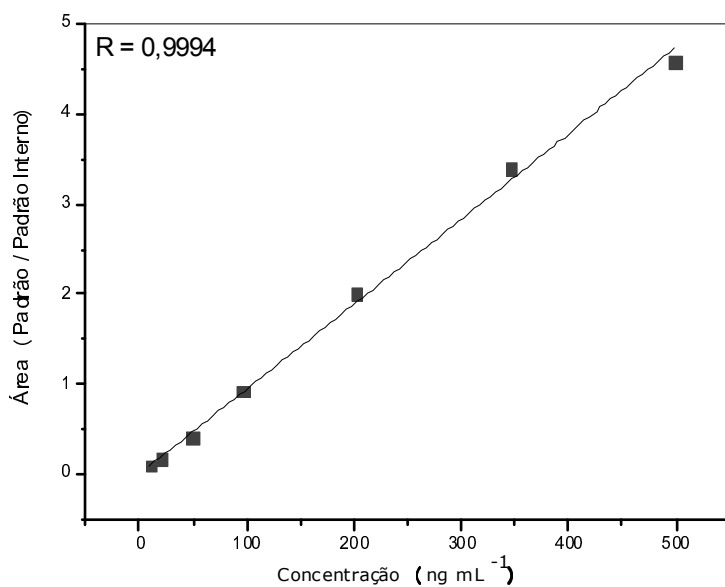


Figura 25. Curva analítica do benzo(a)pireno com seu valor de coeficiente de correlação (R).

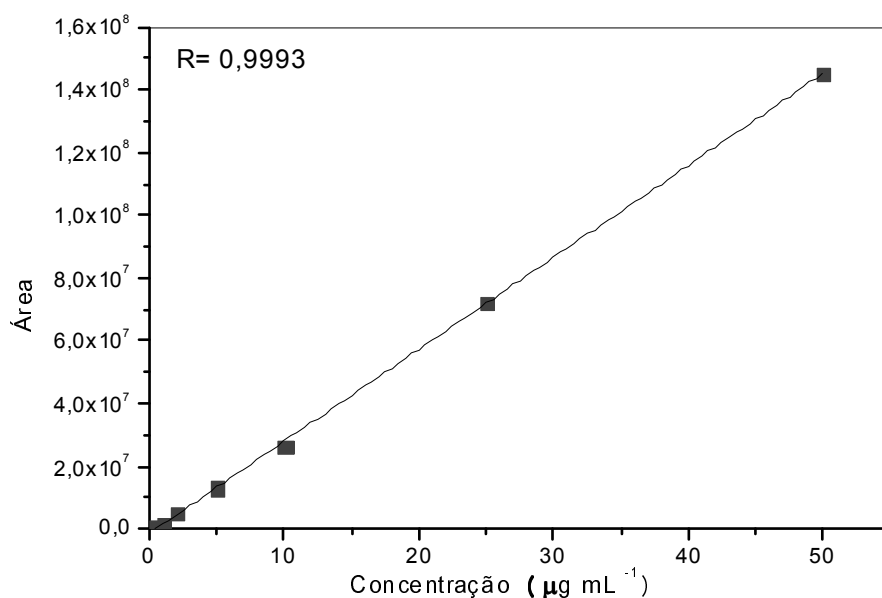


Figura 26. Curva analítica do dodecano (C_{12}) com seu valor de coeficiente de correlação (R).

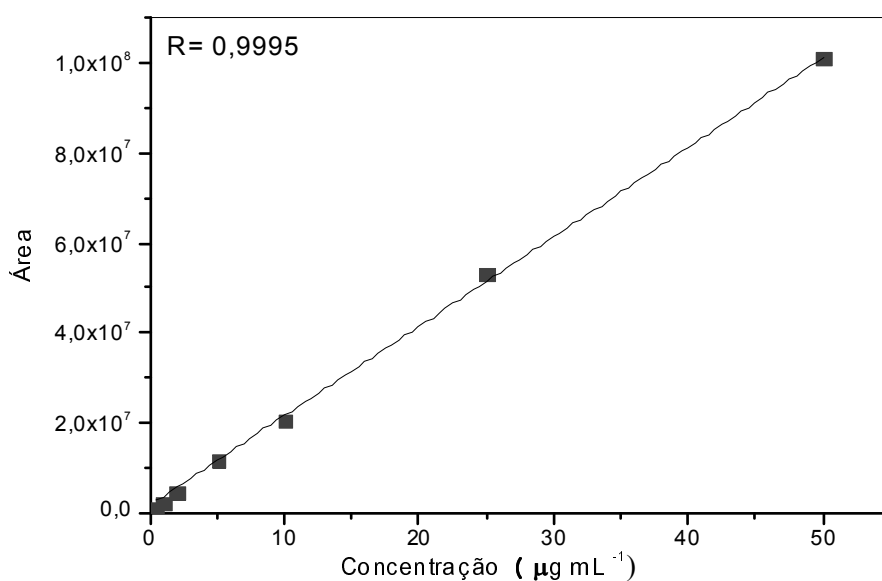


Figura 27. Curva analítica do n-hentriacontano (C_{31}) com seu valor de coeficiente de correlação (R).

De acordo com os resultados encontrados pode-se observar que todas as curvas analíticas apresentaram valores de R maiores do que os recomendados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO

(0,90) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (0,99), sendo satisfatórios para as determinações desejadas

4.4.2 Limites de Detecção e Quantificação

Quando são realizadas medidas de analitos em nível de concentração traço é importante conhecer os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do método que está sendo utilizando. O LD é definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LQ representa a menor concentração que pode ser medida do analito que está sendo determinado (Ribani, 2004). Os limites podem ser calculados de três maneiras diferentes: pelo método visual, método baseado na razão sinal-ruído e aquele com base em parâmetros da curva analítica.

Para os HPA o LD foi calculado com base na razão sinal-ruído fornecida pelo *software* do equipamento e com base nos parâmetros da curva. O LD com base na razão sinal-ruído foi calculado de acordo com a equação que segue, onde, $[C]$ é a menor concentração da curva analítica e S/R representa a razão sinal-ruído.

$$LD = \frac{3 \times [C]}{S/R}$$

Já o LD obtido com base nos parâmetros da curva foi calculado de acordo com a equação abaixo, onde s é a estimativa do desvio padrão da equação da reta e S é o coeficiente angular da reta. O LQ foi considerado a menor concentração da curva analítica. Os valores de LQ e LD obtidos para os HPA estão descritos na Tabela 21.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Tabela 21: Limites de detecção e quantificação obtidos para os HPA.

Composto	LD ¹ (ng mL ⁻¹)	LD ² (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
Naftaleno	0,62	0,03	9,60
Acenaftileno	1,83	0,04	9,60
Acenafteno	0,46	0,02	9,60
Fluoreno	0,64	0,05	9,60
Fenantreno	1,68	0,03	9,60
Antraceno	1,84	0,03	9,60
Fluoranteno	1,57	0,05	9,60
Pireno	3,62	0,04	9,60
Benzo(a)antraceno	3,82	0,03	9,60
Criseno	1,94	0,03	9,60
Benzo(b)fluoranteno	8,25	0,06	9,60
Benzo(k)fluoranteno	9,23	0,03	9,60
Benzo(a)pireno	8,29	0,03	9,60
Indeno(1,2,3-cd)pireno	7,94	0,02	9,60
Dibenzo(a,h)antraceno	9,29	0,02	9,60
Benzo(g,h,i)perileno	7,76	0,02	9,60

¹ Relação sinal-ruído; ² parâmetros da curva.

Os valores de LD escolhidos para os HPA foram os calculados com base nos parâmetros da curva, uma vez que aqueles calculados com base na razão sinal-ruído forneceram valores muito altos e próximos aos dos LQ. Em técnicas cromatográficas, a medição da razão sinal-ruído é algumas vezes subjetiva, e tanto valores de LQ quanto de LD podem ser afetados pelas condições cromatográficas, as quais influenciam no tamanho dos picos, alterando a razão sinal-ruído (Ribani, 2004), resultando em valores LD ou LQ discrepantes. Além disso, como as determinações de HPA foram feitas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, e essa é uma técnica bastante sensível, o ruído do equipamento é alto, impedindo por isso uma determinação correta de LD pelo método da relação sinal-ruído.

Para os hidrocarbonetos alifáticos o LD foi calculado com base na razão sinal-ruído fornecido pelo *software* do equipamento e com base nos parâmetros da curva, seguindo as mesmas equações e cálculos utilizados para os HPA. Os valores de LQ, também foram estabelecidos para todos os compostos como a menor concentração da curva analítica. Os valores de LD e LQ obtidos para os alifáticos encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Limites de detecção e quantificação obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos.

Composto	LD ¹ (µg mL ⁻¹)	LD ² (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)
Dodecano (C ₁₂)	0,02	0,40	0,50
Tridecano (C ₁₃)	0,03	0,51	0,50
Tetradecano (C ₁₄)	0,03	0,35	0,50
Pentadecano (C ₁₅)	0,02	0,24	0,50
Hexadecano (C ₁₆)	0,04	0,39	0,50
Heptadecano (C ₁₇)	0,04	0,76	0,50
Pristano	0,03	0,76	0,50
Octadecano (C ₁₈)	0,05	0,58	0,50
Fitano	0,04	0,49	0,50
Nonadecano (C ₁₉)	0,03	0,30	0,50
Eicosano (C ₂₀)	0,03	0,37	0,50
Heneicosano (C ₂₁)	0,03	0,41	0,50
Docosano (C ₂₂)	0,03	0,40	0,50
Tricosano (C ₂₃)	0,03	0,33	0,50
Tetracosano (C ₂₄)	0,04	0,33	0,50
Pentacosano (C ₂₅)	0,02	0,29	0,50
Hexacosano (C ₂₆)	0,03	0,33	0,50
Heptacosano (C ₂₇)	0,02	0,35	0,50
Octacosano (C ₂₈)	0,02	0,34	0,50
Nonacosano (C ₂₉)	0,04	0,40	0,50
triacontano (C ₃₀)	0,02	0,47	0,50
n-Hentriacontano (C ₃₁)	0,03	0,42	0,50
Dotriacontano (C ₃₂)	0,06	0,42	0,50
Titriacontano (C ₃₃)	0,03	0,47	0,50
Tetratriacontano (C ₃₄)	0,06	0,47	0,50
Pentatriacontano (C ₃₅)	0,05	0,50	0,50
Hexatriacontano (C ₃₆)	0,07	0,52	0,50
Heptatriacontano (C ₃₇)	0,07	0,74	0,50
Octatriacontano (C ₃₈)	0,09	0,62	0,50
Nonatriacontano (C ₃₉)	0,10	0,76	0,50
Tetracontano (C ₄₀)	0,16	0,99	0,50

¹ Relação sinal-ruído; ² parâmetros da curva.

Uma vez que a determinação dos alifáticos é feita por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama, que é uma técnica menos sensível comparada a cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas, não sofrendo muita influência de ruídos do sistema, os melhores valores de LD para os alifáticos

foram os calculados pela relação sinal-ruído. Os valores de LD e LQ encontrados para ambas as classes de compostos, demonstram a boa sensibilidade do método.

4.4.3 Exatidão e Precisão

A análise da precisão de um método tem como objetivo verificar a concordância entre os valores obtidos em diversos ensaios realizados sobre condições definidas (Lanças, 1993; Leite, 2002; Yamada, 2006). A precisão pode ser expressa ou avaliada por meio do desvio padrão absoluto (σ), que requer um número de medições maior que 20, ou através do cálculo da estimativa do desvio padrão absoluto (s), que é comumente utilizada em validações de método com um número pequeno de medições (Ribani, 2004).

A exatidão do método é um parâmetro utilizado para avaliar a concordância entre o resultado experimental obtido por esse, o qual está sendo validado, e por um valor de referência aceito. A exatidão pode ser expressa como percentual de resposta obtido através de experimento empregando uma quantidade conhecida do analito (Yamada, 2006). A exatidão deve ser sempre considerada dentro de certos limites, por isso, aparece sempre associada a valores de precisão, sendo esses limites menores em níveis de concentração elevados e maiores em nível traço de concentração (Ribani, 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são o emprego de materiais de referência certificados, ensaios de recuperação, adição de padrão e comparação de métodos (Zanella, 2007).

4.4.3.1 Teste de Adição e Recuperação de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos

A precisão e exatidão do método foram verificadas, primeiramente, com base na adição de concentrações conhecidas de padrão em amostras de sulfato de sódio calcinadas, sendo a precisão avaliada com base na estimativa do desvio padrão relativo (%) calculado através dos valores de recuperação. Os resultados e desvio obtidos para os HPA e alifáticos encontram-se apresentados nas Figuras 28 e 29.

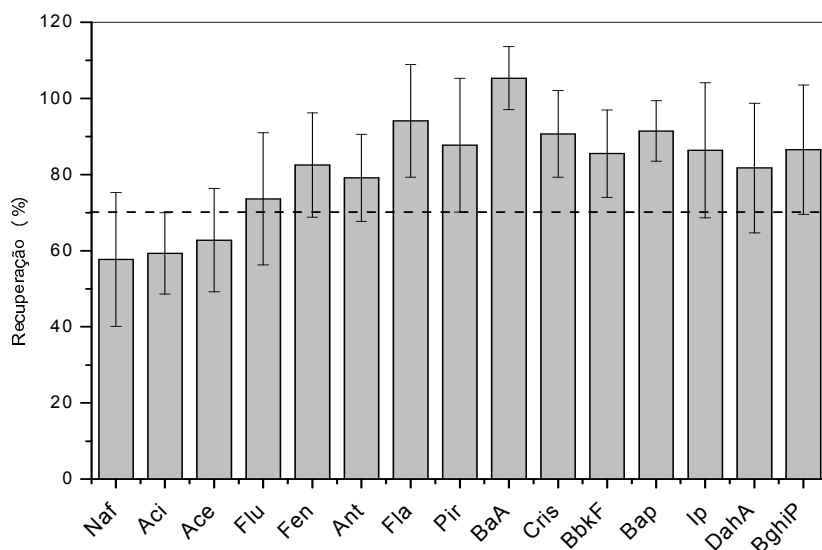


Figura 28. Recuperação e estimativa de desvio padrão (n=6) de *spike* de solução de HPA (150 ng g⁻¹) em sulfato de sódio.

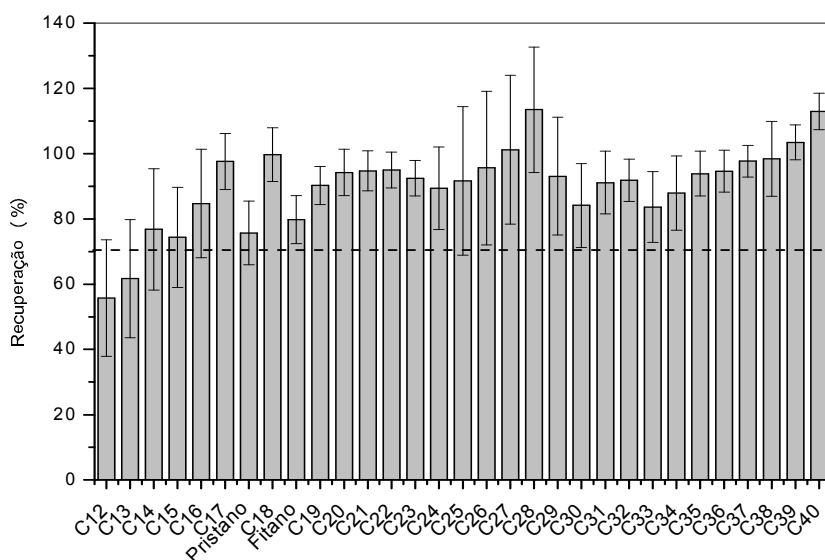


Figura 29. Recuperação e estimativa do desvio padrão (n=6) de *spike* de solução de alifáticos (10 µg g⁻¹) em sulfato de sódio.

Os valores de desvio padrão para os HPA e alifáticos variaram de 8 a 18% e 4 a 23%, respectivamente, sendo esses valores considerados satisfatórios, uma vez que em análise de traços, valores de até 20% são aceitos (INMETRO, 2003). Apenas os alifáticos, C₂₅, C₂₆ e C₂₇ apresentaram valores superiores a 20%, em função de problemas de co-eluição que prejudicaram a integração das áreas desses compostos.

As faixas de recuperação obtidas para os HPA e alifáticos foram de 59-105% e de 55-113%, sendo esses valores considerados satisfatório para a grande maioria dos compostos. Alguns HPA, como naftaleno, acenaftileno e acenafteno, apresentaram recuperações menores de 70%, em função de perdas por volatilidade que ocorrem ao longo das etapas de concentração e extração, o que ficou evidenciado pelos testes de recuperação apresentados para essas etapas. Em relação aos alifáticos, os compostos que apresentaram recuperações não satisfatórias (C_{12} e C_{13}), também sofrem as mesmas influências que os HPA. Ambas as classes de compostos sofrem ainda perdas, conforme previamente relatadas, na etapa de *cleanup*.

Além dos 16 HPA e alifáticos, foram avaliados também a recuperação obtida pelos padrões subrogados adicionados juntamente com os padrões. Na Tabela 23, encontram os percentuais de recuperação obtidos para os padrões subrogados de aromáticos e alifáticos, respectivamente. Com base nos resultados obtidos pode-se considerar que os testes de adição e recuperação foram bastante satisfatórios. Além disso, esses resultados mostraram que o tempo de extração de 4 horas foi suficiente para recuperar os analitos da amostra de sulfato.

Tabela 23: Percentuais de recuperação e estimativa de desvio padrão relativo (n=6) obtido para os padrões subrogados p-terfenil-d e Eicosano(C_{20d}).

Composto	Recuperação (%)	Desvio (%)
p-terfenil-d14	73	12,6
Eicosano (n- C_{20d})	94	4,6

4.4.3.2 Extração de Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos de Material de Referência

Os valores de recuperação obtidos para a extração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos do sedimento utilizado como referência estão apresentados nas Figuras 30 e 31, respectivamente, a seguir.

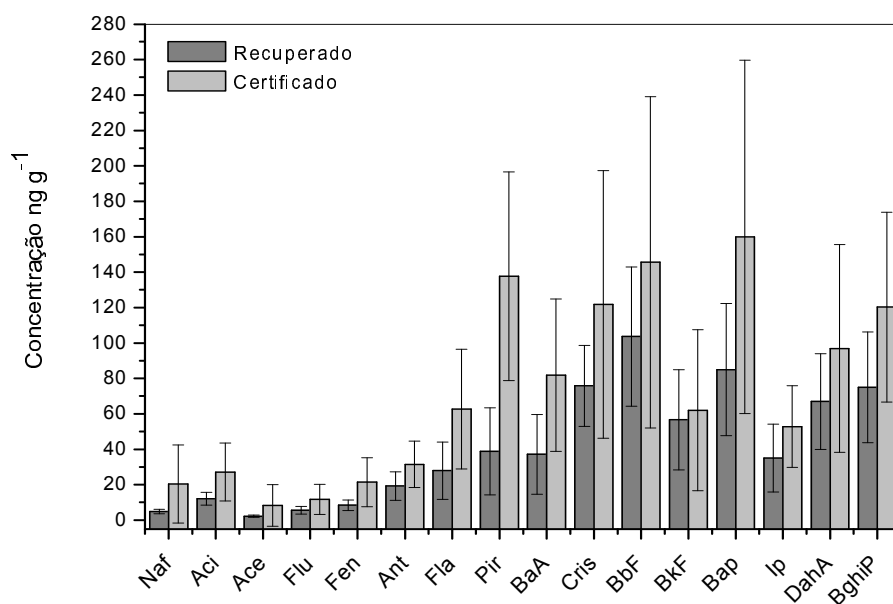


Figura 30. Concentração média (n=10) de HPA recuperada e concentração média (n=13) de sedimento de referência (LABMAM) e respectivas estimativas de desvio padrão absoluto.

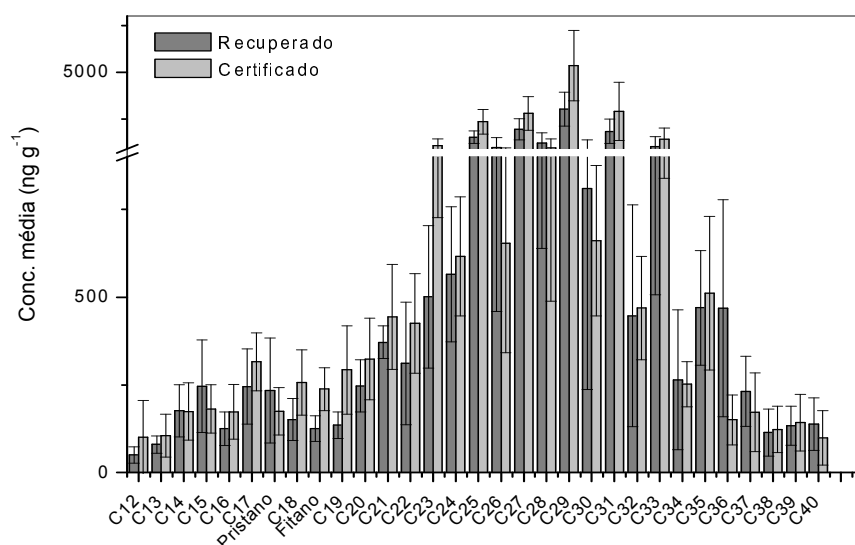


Figura 31. Concentração média (n=10) de alifáticos recuperada e concentração média (n=13) no material de referência (LABMAM) e respectivas estimativas de desvio padrão absoluto.

Os valores de estimativa de desvio padrão absoluto para os HPA (Figura 30) foram de 1,2 a 39, sendo que os desvios do material de referência se encontram entre 8,4 e 97. Para todos os HPA, os valores de desvio obtidos nessas análises foram

menores que valores de referência do sedimento utilizado. Apesar dos valores de concentração encontrados serem inferiores aos de referência, com percentuais de recuperação abaixo de 70% para alguns HPA (Tabela 24), esses valores se encontram dentro dos desvios apresentados pelo material de referência sendo, portanto considerados satisfatórios. Além disso, os valores de recuperação do padrão subrogado adicionado (Tabela 24) também apresentaram valores considerados aceitáveis pela literatura (INMETRO, 2003).

Tabela 24: Recuperação média de HPA (n=10) no material de referência e do padrão subrogado *p*-terfenil-*d*14.

Composto	Recuperação (%)
Naftaleno	23
Acenaftileno	50
Acenafteno	37
Fluoreno	43
Fenantreno	55
Antraceno	37
Fluoranteno	46
Pireno	29
Benzo(a)antraceno	109
Criseno	80
Benzo (b)fluoranteno	91
Benzo(k)fluoranteno	123
Benzo(a)pireno	67
Indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pireno	84
Dibenzo(a,h)antraceno	83
Benzo(g,h,i)perileno	67
<i>p</i> -terfenil- <i>d</i> 14	80

Com relação aos resultados obtidos para os alifáticos, apresentados na Figura 29, os valores de estimativa de desvio padrão foram inferiores aos apresentados pelo material de referência. Além disso, a faixa de recuperação para a maioria dos compostos ficou entre 70 e 120% (tabela 25), com um valor de recuperação satisfatório para o padrão subrogado adicionado. Observa-se também uma melhor recuperação dos compostos intermediários, os quais são menos influenciados por perdas por volatilização, além de estarem em maior concentração no material de referência.

Tabela 25: Recuperação média de alifáticos (n=10) do material de referência e do padrão subrogado Eicosano (n-C_{20d}).

Composto	Recuperação (%)
Dodecano (C ₁₂)	50
Tridecano (C ₁₃)	76
Tetradecano (C ₁₄)	101
Pentadecano (C ₁₅)	135
Hexadecano (C ₁₆)	72
Heptadecano (C ₁₇)	77
Pristano	134
Octadecano (C ₁₈)	59
Fitano	53
Nonadecano (C ₁₉)	46
Eicosano (C ₂₀)	76
Heneicosano (C ₂₁)	83
Docosano (C ₂₂)	73
Tricosano (C ₂₃)	46
Tetracosano (C ₂₄)	91
Pentacosano (C ₂₅)	65
Hexacosano (C ₂₆)	150
Heptacosano (C ₂₇)	70
Octacosano (C ₂₈)	125
Nonacosano (C ₂₉)	57
triacontano (C ₃₀)	120
n-Hentriacontano (C ₃₁)	63
Dotriacontano (C ₃₂)	95
Titriacontano (C ₃₃)	72
Tetratriacontano (C ₃₄)	105
Pentatriacontano (C ₃₅)	92
Hexatriacontano (C ₃₆)	128
Heptatriacontano (C ₃₇)	118
Octatriacontano (C ₃₈)	93
Nonatriacontano (C ₃₉)	94
Tetracontano (C ₄₀)	140
Eicosano (C _{20d})	95

5. Conclusões

Com a realização do presente trabalho ficou evidente a dificuldade em se determinar os compostos de interesse, em concentrações traço, presentes em matrizes complexas. Isso ocorre uma vez que o processo analítico envolve um grande número de etapas críticas, que precisam ser cuidadosamente realizadas. Além disso, observa-se na literatura um grande número de diferentes condições para realizar os procedimentos mesmo se partindo de um método padrão.

De maneira geral, as condições de trabalho empregadas nesse trabalho na extração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por sistema soxhlet propiciaram a adequação e aperfeiçoamento de um método já consolidado. As mudanças realizadas nas etapas de concentração e extração diminuíram consideravelmente as perdas de compostos por volatilização, principalmente para os HPA que apresentam maior pressão de vapor. Na etapa de *cleanup*, os testes realizados forneceram resultados satisfatórios tanto para a determinação de THP quanto para a separação dos compostos em fração de alifáticos e aromáticos, evidenciando a importância da escolha correta do solvente de eluição na eficiência desta etapa. Os resultados obtidos com a validação do método demonstram que a avaliação das diversas etapas do processo proporcionou a melhoria de um método já consolidado, sendo possível obter resultados com níveis elevados de confiabilidade analítica.

6. Referências Bibliográficas

- Aboul-Kassim, T.A.T., Simoneit, B.R.T., 1996. Lipid geochemistry of surficial sediments from the coastal environment of Egypt. 1. Aliphatic hydrocarbons – characterization and sources. *Mar. Chem.* 54, 135– 158.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, autor institucional, Portaria MS nº 518, 2004.
- Almeida, F. V. Bases técnico-científicas para o desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimentos referentes a compostos orgânicos persistentes. *Tese de Doutorado*. UNICAMP, Campinas – SP, 2003.
- Baird, C. *Química Ambiental*. 2ª ed., Trad. Recio, Maria Angeles L. e Carrera, Luiz Carlos M. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- Berset, J. D., Ejem, M., Holzer, R., Lischer, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for determination of priority aromatics hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Acta*, 383, 263-272, 1999.
- Bícego, M. C., Taniguchi, S., Yogui, G. T., Montone, R. C., Silva, D. A. M. Lourenço, R. A., Martins, C. C., Sasaki S. T., Pellizari, V. H., Weber, R. R. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1784-1832, 2006.

- Bossio, J. P., Harry, J., Kinney, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere* 70, 858-864, 2008.
- Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P., Menach, K. Le. Optimization of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments Study of moisture effect. *Journal of Chromatography A*, 837, 187-200, 1999.
- Brum, M. D., Netto, P. D. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG, Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 447- 453, 2009.
- Cavalcante, M. R. Otimização de metodologias de extração e análise de HPA para determinação da distribuição ambiental e estimativa de fontes na cidade de Fortaleza. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 2007.
- Crespo, M. O. P., Yuist, M. A. L. Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of aliphatic hydrocarbons in seaweed samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 400-405, 2006.
- CETESB, Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo, Relatórios Ambientais, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Estado do Meio Ambiente, 1999.
- Coimbra, C. A. M. Avaliação dos resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrumento jurídico em casos de derrame de petróleo: mangue de Bertioga. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 2006.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Resolução CONAMA nº 357, 2005.
- Chu, W. and Chan, K.H. The prediction of partitioning coefficients for chemicals causing environmental concern. *The Science of the Total Environment* 248, 1-10, 2000.
- Comendatore, M. G., Esteves, J. L. Natural and Anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 48, 910-918, 2004.
- Dean, J. R. *Extraction Methods for Environmental Analysis*. Volume único, John Wiley & Sons Ltd, 107-112, 1998.
- Del Rosso, C., B. Avaliação dos Aportes de Hidrocarbonetos à Lagoa dos Patos (RS – Brasil). *Dissertação de Mestrado*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Geociências, Rio Grande, 2005.
- Fronza, L. Capacidade de liberação de hidrocarbonetos dos sedimentos de áreas contaminadas do estuário da Lagoa dos Patos – RS. *Dissertação de Mestrado*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Geociências, Rio Grande, 2006.
- Furlan, O., J. Distribuição de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em solos da região da serra catarinense – Comparação entre metodologias de extração e avaliação de impactos ambiental. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.
- Gan, S., Lau, V. E., Ng, K. H. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172, 532-549, 2009.
- Garcia, M.R.D. Contribuição de efluentes urbano-industriais da cidade do Rio Grande na contaminação por HPA dos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS). *Dissertação de Mestrado*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. RS, 2005.
- Gao, X., Chen, S. Petroleum pollution in surface sediments of Daya Bay, South China, revealed by chemical fingerprinting of aliphatic and alicyclic hydrocarbons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80, 95-102, 2008.
- Gu, S.H., Kralovec, A.C., Christensen, E.R., Van Camp, R. Source apportionment of PAHs in dated sediments from the Black River, Ohio. *Water Research*, 37, 2149-2161, 2003.

- Heemken, O. P., Theobald, N., Wencławiak, B. W. Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, Sonication, and Methanolic Saponification Extractions for the Determination of Organic Micropollutants in Marine Particulate Matter. *Analytica Chemistry*, 69, 2171-2180, 1997.
- Helaleh, M.I.H., Al-Omaie, A., Nisan, A., Gevao, B. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 153-161, 2005.
- INMETRO, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, revisão 1, 2003.
- Jardim, W. F., Sodré, F. F. Desempenho Analítico de Laboratórios Prestadores de Serviço na Determinação de Metais em Água. *Química Nova*, 32, 1083-1088, 2009.
- Lanças, F. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. Editora Rima: São Paulo, 9-28, 2004.
- Leite, N.F. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em sedimentos: Desenvolvimento analítico e diagnóstico ambiental. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- Leite, N. F., Zamora, P. G. P., Grassi, M.T. Multifactorial optimization approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river sediments by gas chromatography - quadrupole ion trap selected ion storage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1192, 273-281, 2008.
- Luz, L. P., Filho, P. J. S., Sousa, E. E. H., Kerstner, T., Caramão, E. B. Evaluation of surface sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Colony Z3 – (Patos Lagoon, Brazil). *Microchemical Journal*, 2010.
- Librando V., Hutzinger, O., Tringali, G., Aresta, M. Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples. *Chemosphere*, 54, 1189-1197, 2004.
- Locatelli, F., A., M. Investigação sobre a emissão e caracterização dos Hidrocarbonetos aromáticos na bacia do rio Atibaia. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- Martins, C. C., Bicego M.C., Taniguchi S., Montone R.C. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, 16, 117-122, 2004.
- Massone, G. C. Caracterização de hidrocarbonetos na região costeira do Rio Paraíba do Sul, Estação de Tratamento de Efluentes de Cabiúnas e Emissário de Ipanema, RJ. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, 2004.
- Meniconi, M., F., G. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- Mostafa, R. A., Wade, L. T., Sweet, T.S., Al-Alimi, A. K. A., Barakat O. A. Distribution and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Hadhramout coastal area, Gulf of Aden, Yemen. *Journal of Marine Systems*, 78, 1-8, 2009.
- Mouhri, A., Motelay-Masei, A., Masei, N., Fournier, M., Laignel, B. Polycyclic aromatic hydrocarbon transport processes on the scale of a flood event in the rural watershed of Le Bebec, France. *Chemosphere*, 73, 443-450, 2008.
- Ockender, W.A., Breivik, K., Meijer, S.N., Steinnes, E., Sweetman, A.J., Jones, K.C. The global re-cycling of persistent organic pollutants is strongly retarded by soils. *Environmental Pollution*, 121, 75-80, 2003.
- Orecchio, S. Analytical method, pattern and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the stone of the Temples of Agrigento (Italy). *Journal of Hazardous Materials*, 176, 339-347, 2010.
- Pietzsch, R., Patchineelam, R. S., Torres, M. P. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments from a subtropical estuary in Brazil. *Marine Chemistry*, 118, 56-66, 2010.

- Pino, V., Ayala, J. H., Afonso, A. M., González, V. Micellar microwave-assisted extraction combined with solid-phase microextraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a certified marine sediment. *Analytica Chimica Acta*, 477, 81-91, 2003.
- Qualised. Projeto de pesquisa para avaliação dos critérios de qualidade do sedimento da bacia hidrográfica do Rio Tietê. Estado de São Paulo. Disponível em: <http://lavoisier.dq.ufscar.br/> acessado em 06/05/2009.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.F. & Melo, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771- 780, 2004.
- Richter, P., Jiménez, M., Salazar, R., Maricán, A. Ultrasound-assisted pressurized solvent extraction for aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. *Journal of Chromatography A*, 1132, 15-20, 2006.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M. Environmental Organic Chemistry. USA: Wiley-Interscience, 1995.
- Serrano, A., Gallego M. Continuous microwave-assisted extraction coupled on-line with liquid-liquid extraction: Determination of aliphatic hydrocarbons in soil and sediments. *Journal of Chromatography A*, 1104, 323-330, 2006.
- Smeds, F., Boer, J. de. Determination of chlorobiphenyls in sediments: analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 503-512, 1997.
- Steinhauer, M.S., Boehm, P.D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in near shore sediments, river sediments, and coastal peat of Alaskan Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbon inputs. *Marine Environmental Research*, 33, 223-253, 1992.
- Silva, C, A. Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia, 2007.
- Sun, P.; WEAVERS, K. L.; TAERAKUL, P.; WALKER, H. W. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Lime Spray Dryer (LSD) Ash Using Different Extraction Methods. *Chemosphere*. 2005.
- Tolosa, I., Mora, S., Sheikholeslami, M. R., Villeneuve, J., Bartocci, J., Cattini, C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 44-60, 2004.
- Thompson, M., Elisson, R., L., S., Wood, R. Harmonized Guidelines for singles laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem*, 74, 835-855, 2002.
- UNEP – United Nations Environment Programme - Chemicals. Regionally Based Assessment Persistent Toxic Substances (Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Ecuador, Paraguay, Peru, Uruguay). Switzerland: UNEP Chemicals, 2002. Disponível em: www.chem.unep.ch/pts/regreports/, acessado em 28/05/2009.
- U.S. EPA Risk Assessment Handbook: Human Health Evaluation Manual 200:1-4. Washington, DC. 1995.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency – *Method 8000 Determinative chromatographic separations*, 1996. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 15 de Junho de 2009.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency – *Method 3540C Soxhlet Extraction*, 1996. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2010.
- U.S. EPA – Environmental Protection Agency – *Method 3550C Ultrasonic Extraction*, 2007. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2010.
- Ventura, G. T., Kenig, F., Reddy, C. M., Frysinger, G. S., Nelson, R. K. Mooy, B. Gaines, R. B. Analysis of unresolved complex mixtures of hydrocarbons extracted from Late Archean sediments by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC-GC). *Organic Geochemistry*, 39, 846-867, 2008.

- Venkatesan, M.I. & Kaplan, I.R. 1982. Distribution and transport of hydrocarbons in surface sediments of Alaskan outer continental shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46, 2135–2149.
- Viganò, L., Arillo, A., Buffagni, A., Camusso, M., Ciannarella, R. Crosa, G., Falugi, C., Galassi, S., Guzzella, L., Lopez, A., Mingazzini, M., Pagnotta, R., Patrolecco, L.; Tartari, G., Valsecchi, S. Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy). *Water Research*, 37, 501-518, 2003.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P., and Bavor, J. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of the Total Environment*, 112, 203-219, 1992.
- Wolska, L., Galer, K., Namiesnik, J. Transport and speciation of PAHs and PCBs in a river ecosystem. *Polish J. Environ. Studies*, 12, 105-110, 2003.
- Yamada, T. M. Determinação de fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alifáticos em sedimentos de ambientes aquáticos. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, 2006.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., and Sylvestre, S. PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33, 489-515, 2002.
- Wu, Y., Shang, J., Mi, T. Z., Li, B. Occurrence of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments of the Yellow Sea. *Marine Chemistry*, 76, 112-119, 2001.
- ZANELLA, R, Prestes, Osmar D. ; Presta, Michele A. ; KOLBERG, Diana I. S. ; ZANELLA, R. ; Rossato, Simone B. ; PENNA, Neidi G. ; HECKTHEUER, Luisa H. R. . Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova* ^{JCR}, v. 30, p. 18-21, 2007.

Nome do arquivo: Dissertação_Vânia_Ribeiro_Ferreira_01
Diretório: C:\Users\Vânia\Desktop
Modelo: C:\Users\Vânia\AppData\Roaming\Microsoft\Modelos\Norma
l.dotm
Título: Universidade Federal do Paraná
Assunto:
Autor: Andreia
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 31/10/2011 15:33:00
Número de alterações: 4
Última gravação: 31/10/2011 15:40:00
Salvo por: Vânia
Tempo total de edição: 5 Minutos
Última impressão: 31/10/2011 15:41:00
Como a última impressão
Número de páginas: 74
Número de palavras: 20.489 (aprox.)
Número de caracteres: 110.645 (aprox.)